



Estudio en cultivos celulares del efecto de nanomoléculas con potencial terapéutico

TESIS DOCTORAL

Jorge Soriano Martín

**Unidad de Citología, Departamento de Biología
Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid**

Madrid, julio de 2013



**FACULTAD DE
CIENCIAS**
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Memoria presentada por **Jorge Soriano Martín**
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Proyecto de tesis dirigido por
la Dra. **Magdalena Cañete Gugel**
Catedrática de Biología Celular
de la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, julio de 2013

Índice

Abreviaturas más frecuentes	11
Capítulo 1.	13
INTRODUCCIÓN	15
1. Terapia Fotodinámica	15
1.1. ¿Cómo actúa la TFD?	16
1.2. Fotosensibilizantes	19
1.3. TFD y cultivos celulares	21
1.3.1. Dosis de tratamiento	21
1.3.2. Tipo celular	23
1.3.3. Localización subcelular	23
1.3.4. Vehiculización.....	25
2. Muerte celular	31
2.1. Apoptosis.....	33
2.1.1. Apoptosis desencadenada por la vía mitocondrial o intrínseca	34
2.1.2. Apoptosis dependiente de receptor de muerte o extrínseca	35
2.1.3. Apoptosis independiente de caspasas	38
2.1.4. TFD y apoptosis	39
2.2. Necrosis	40
2.2.1. TFD y necrosis	42
2.3. Autofagia.....	43
2.3.1. Autofagia como mecanismo de muerte celular	44
2.3.2. TFD y autofagia	46
2.4. Otros tipos de muerte celular.....	47
Capítulo 1A.....	49
1A.1. Resumen	51
1A.2. Objetivos.....	51
1A.3. Resultados	53
1A.3.1. Supervivencia celular	53
1A.3.2. Morfología nuclear	53
1A.3.3. Ensayo TUNEL	55

1A.3.4. Ensayo Annexina V/ Ioduro de propidio (ANV/IP)	56
1A.3.5. Localización subcelular.....	57
1A.3.6. Aparato de Golgi	57
1A.3.7. Caspasa-2 activa	58
1A.3.8. Citocromo C.....	59
1A.3.9. Tratamientos en presencia de Necrostatina-1	60
1A.3.9.1. Supervivencia celular.....	60
1A.3.9.2. Morfología nuclear	61
1A.4. <i>Discusión</i>	65
1A.5. <i>Conclusiones</i>	74
Capítulo 1B.	75
1B.1. <i>Resumen:</i>	77
1B.2. <i>Objetivos:</i>	78
1B.3. <i>Resultados</i>	79
1B.3.1. Propiedades fotofísicas del m-THPPo.....	79
1B.3.2. Caracterización del m-tetrahidroxifenil-porficeno (m-THPPo) disuelto en DMSO	81
1B.3.2.1. Supervivencia celular	81
1B.3.2.2. Localización subcelular	81
1B.3.2.3. Morfología nuclear.....	82
1B.3.3. Caracterización del m-THPPo incluido en liposomas (m-THPPo-lip).....	83
1B.3.3.1. Encapsulación del m-THPPo en liposomas de nueva formulación.....	83
1B.3.3.2. Propiedades fotofísicas	84
1B.3.3.3. Supervivencia celular	85
1B.3.3.4. Localización subcelular	85
1B.3.3.5. Morfología celular	86
1B.3.3.6. Morfología nuclear.....	87
1B.3.4. Mecanismos de muerte celular	89
1B.3.4.1. Ensayo TUNEL	89
1B.3.4.2. Ensayo annexina V/ioduro de propidio (ANV/IP)	90
1B.3.4.3. Muerte celular	92
1B.3.4.4. Inmunofluorescencia indirecta para citocromo C	93
1B.3.4.5. Inmunofluorescencia indirecta para caspasa-2 activa	94
1B.4. <i>Discusión</i>	95
1B.5. <i>Conclusiones</i>	99
Bibliografía.....	101

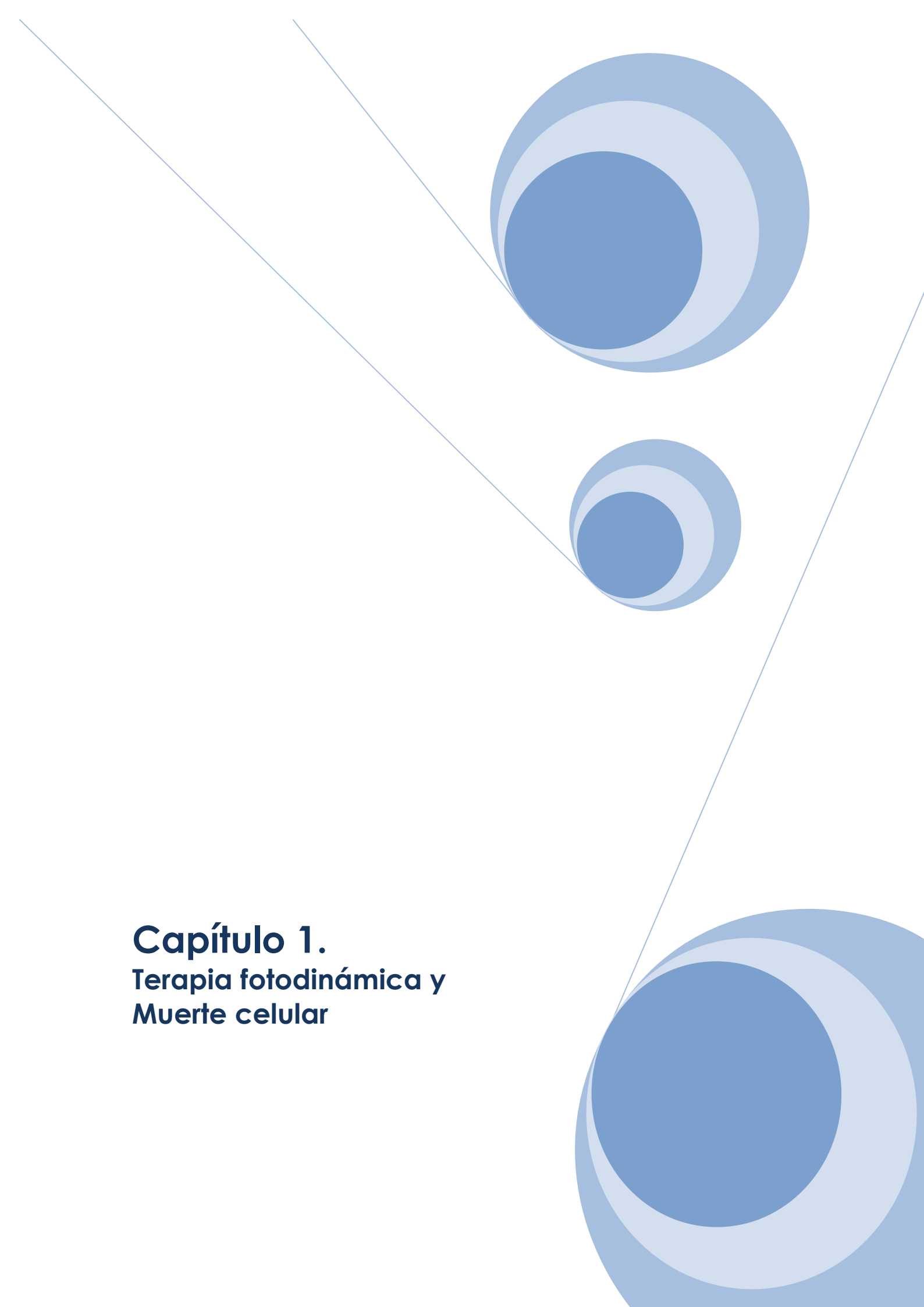
Capítulo 2.	119
INTRODUCCIÓN	121
1. Endocitosis	121
1.1. ¿Qué es la endocitosis?	122
1.2. Mecanismos de endocitosis	123
1.2.1. Macropinocitosis	124
1.2.2. Endocitosis mediada por clatrina	125
1.2.3. Endocitosis mediada por caveolina	129
1.2.4. Endocitosis mediada por receptor e independiente de clatrina y caveolina	133
1.3. Factores que determinan el mecanismo endocítico	134
1.3.1. Tamaño de la molécula	134
1.3.2. Carga del compuesto	134
1.3.3. Modificaciones del compuesto	134
1.3.4. Tipo celular	135
1.3.5. Forma del compuesto	136
2.1. Resumen	137
2.2. Objetivos	137
2.3. Resultados. Células A-549	139
2.3.1. Tratamientos fotodinámicos en ausencia de inhibidores	139
2.3.1.1. Supervivencia celular	139
2.3.1.2. Morfología nuclear	140
2.3.1.3. Localización subcelular	141
2.3.2. Tratamientos con inhibidores de la endocitosis	141
2.3.2.1. Supervivencia celular	141
2.3.2.2. Morfología nuclear	142
2.3.3. Tratamientos con CD	143
2.3.3.1. Microfilamentos de actina	143
2.3.3.2. Microtúbulos	144
2.3.3.3. Binucleación e índice mitótico	146
2.3.4. Tratamientos fotodinámicos con ZnPC en presencia de inhibidores de la endocitosis	147
2.3.4.1. Supervivencia celular	147
2.3.4.2. Morfología nuclear	148

2.3.4.3. Localización subcelular	150
2.4. Resultados. Células HeLa	153
2.4.1. Tratamientos fotodinámicos en ausencia de inhibidores.....	153
2.4.1.1. Supervivencia celular.....	153
2.4.1.2. Morfología nuclear	154
2.4.1.3. Localización subcelular	155
2.4.2. Tratamientos con inhibidores de la endocitosis.....	155
2.4.2.1. Supervivencia celular.....	155
2.4.2.2. Morfología nuclear	156
2.4.3. Tratamientos fotodinámicos en presencia de inhibidores de la endocitosis	157
2.4.3.1. Supervivencia celular.....	157
2.4.3.2. Morfología nuclear	158
2.4.3.3. Localización subcelular	160
2.5. Discusión.....	163
2.5.1. Dynasore (Dyn)	165
2.5.2. Citocalasina (CD)	167
2.5.3. Genisteina (Gen).....	171
2.5.4. Metil- β -ciclodextrina (M β CD)	172
2.6. Conclusiones	173
Bibliografía.....	175
Material y métodos.....	187
1. Cultivos celulares	189
2. ZnPc incluida en liposomas	189
3. ZnPc disuelta en DMF	190
4. m-THPPo disuelto en DMSO	190
5. m-THPPo incluido en liposomas.....	190
6. Localización subcelular.....	191
7. Tinción de mitocondrias in vivo con Mitotracker® Green	191
8. Tinción de lisosomas in vivo con Lysotracker® Green	191
9. Tratamientos fotodinámicos.....	192
10. Fuente de irradiación	192
11. Inhibidores de la endocitosis	192
11.1. Dynasore (Dyn)	193
11.2. Citocalasina D (CD)	193

11.3. Genisteína (Gen).....	193
11.4. Metil- β -ciclodextrina (M β CD)	194
12. Tratamientos fotodinámicos en presencia de inhibidores de la endocitosis....	194
13. Supervivencia celular.....	195
14. Tinción con Hoechst 33258	195
15. Tinción con azul de toluidina.....	196
16. Ensayo TUNEL	196
17. Ensayo Annexina V/Ioduro de propidio.....	196
18. Inmunofluorescencia indirecta para caspasa-2 activa	197
19. Inmunofluorescencia indirecta para golgina-130.....	198
20. Inmunofluorescencia indirecta para citocromo C	198
22. Tinción con faloidina conjugada con rodamina (TRITC- faloidina)	199
22. Inmunofluorescencia indirecta para tubulina	200
23. Espectroscopía.....	200
24. Microscopía	201
25. Bibliografía	201
Conclusiones finales.....	203
Publicaciones relacionadas con esta tesis	205
Agradecimientos	207

Abreviaturas más frecuentes

AG	Aparato de Golgi
ANV	Annexina-V
ASB	Albúmina sérica bovina
AT	Azul de toluidina
CD	Citocalasina D
Cit C	Citocromo C
DMEN	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimetilformamida
DMPG	Dimirostoilfosfatidil-glicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPC	Dipalmitoilfosfatidil-colina
Dyn	Dynasore
FS	Fotosensibilizante
Gen	Genisteina
GM-130	Golgina-130
H-33258	Hoechst 33258
IM	Índice mitótico
IP	Ioduro de propidio
MβCD	Metil-β-ciclodextrina
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
m-THPC	<i>m</i> -tetrahidroxifenil-clorina
m-THPPo	<i>m</i> -tetrahidroxifenil-porficeno
m-THPPo-DMSO	<i>m</i> -tetrahidroxifenil-porficeno vehiculizado en DMSO
m-THPPo-lip	<i>m</i> -tetrahidroxifenil-porficeno incluido en liposomas
Nec-1	Necrostatina-1
¹O₂	Oxígeno singlete
PS	Fosfatidil-serina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
TFD	Terapia fotodinámica
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling
UV	Ultravioleta
ZnPc	ftalocianina de zinc (II)
ZnPc-DMF	ftalocianina de zinc (II) vehiculizada en DMF
ZnPc-lip	ftalocianina de zinc (II) incluida en liposoma

The background features an abstract design with three blue circles of varying sizes. Each circle is composed of three concentric layers: a dark blue center, a medium blue middle ring, and a light blue outer ring. Two thin, light blue lines originate from the top left and extend diagonally across the page, passing behind the circles. The text is positioned in the lower-left quadrant.

Capítulo 1.

Terapia fotodinámica y Muerte celular

INTRODUCCIÓN

1. Terapia Fotodinámica

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica que se utiliza principalmente para el tratamiento del cáncer y otras patologías (Dolmans y col, 2003; Juarranz y col, 2008; Agostinis y col, 2011; Allison y Moghissi, 2013).

Dentro del campo de la oncología, la TFD se aplica para tratar gran variedad de tumores, tales como de cabeza y cuello (este grupo engloba tumores cerebrales, de las cavidades orales y nasales, además de tumores de faringe y laringe), de piel, gastrointestinales, ginecológicos, pulmonares o urológicos (Fayter y col, 2010; Agostinis y col, 2011).

La TFD presenta mayor eficacia en el tratamiento de tumores de pequeño tamaño, que pueden ser irradiados directamente o mediante endoscopia, salvo en el caso de los tumores cerebrales, donde es necesario recurrir a la cirugía para poder acceder al tumor. Aunque en algunos casos, la TFD por sí sola no es capaz de provocar la regresión total del tumor, sí consigue ralentizar la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida del paciente.

En el caso de enfermedades no oncológicas, cabe destacar su utilización en el campo de la oftalmología, para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, además de otras enfermedades oculares, como la neovascularización coroidal o el hemangioma coroidal (Silva y col, 2008; Shah y col, 2009; Elizalde y col, 2012). También se aplica para el tratamiento de enfermedades dermatológicas, como la psoriasis, el acné o el escleroderma (Issa y Manela-Azulay, 2010; Lee y Baron, 2011); cardiovasculares, como es el caso de la arteriosclerosis, la hiperplasia o la restenosis (Kossodo y LaMuraglia, 2001; Waksman y col, 2008); o en el campo de la reumatología para tratar la artritis (Hansch y col, 2008).

Por otro lado, la mayoría de los compuestos fotosensibilizantes utilizados en TFD, son capaces de fluorescer al ser excitados con luz de una longitud de onda determinada, lo que permite su aplicación para la localización y el diagnóstico de tumores (Otto y col, 2011; Seitz y col, 2012).

En el área de la microbiología, se está desarrollando su utilización para el tratamiento de infecciones microbianas localizadas, como heridas o úlceras infectadas, la sinusitis, la candidiasis oral, la periodontitis o infecciones pulmonares. Estas infecciones pueden ser de diversa naturaleza: bacteriana, vírica, fúngica o parásita (Cassidy y col, 2009; Denis y col, 2011). Además, se utiliza para la desinfección de sangre para transfusiones o la esterilización de superficies. En este último caso, se están desarrollando materiales con actividad fotodinámica, de modo que bajo unas condiciones de luz normales, se mantienen estériles, pudiéndose aplicar para mantener la asepsia en hospitales o en laboratorios.

En campos distintos a la Medicina, la TFD se está utilizando en el tratamiento de aguas contaminadas por microorganismos, ya sea para el consumo humano o para fines industriales, tales como desinfección de piscifactorías (Kussovsky y col, 2001; Cassidy y col, 2009).

1.1. ¿Cómo actúa la TFD?

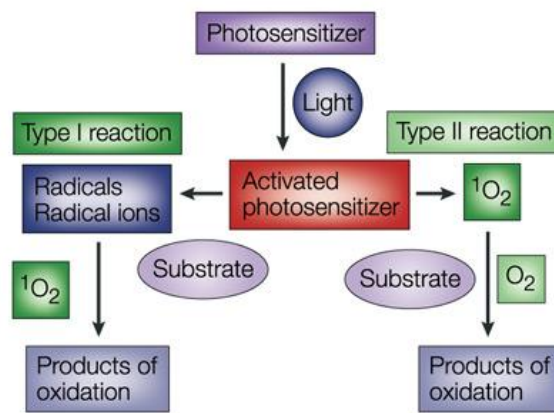
La TFD requiere la acción conjunta de tres componentes que por sí solos no son tóxicos, pero que al combinarse provocan un efecto fotosensibilizante en células y tejidos. Los tres elementos requeridos son:

- Un compuesto fototóxico (fotosensibilizante), que se acumule principalmente en las células u órganos diana.
- Luz de una determinada longitud de onda que active al fotosensibilizante (FS). Normalmente se utiliza luz roja, porque es la que presenta una mayor capacidad de penetración en los tejidos.
- Oxígeno, para que la reacción sea posible.

El mecanismo de actuación de la TFD (Dolmans y col, 2003; Juarranz y col, 2008; Agostinis y col, 2011) es el siguiente: el FS al ser excitado por la luz, pasa de un estado basal a un estado excitado triplete, desde el cual es capaz de transferir electrones a las moléculas vecinas, volviendo el FS a su estado basal. Esto provoca que se generen radicales libres, que interaccionan con el oxígeno, dando lugar a distintas especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo

(OH·), que son agentes altamente reactivos y tóxicos, causantes de la muerte celular: reacción tipo I (Fig. 1).

El FS excitado también puede transferir directamente sus electrones al oxígeno, generando otro tipo de ROS, el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), una forma muy reactiva del oxígeno, capaz de interaccionar con distintas moléculas biológicas como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, ocasionando la muerte celular: reacción tipo II (Fig. 1). Mientras esta vía predomina en medios ricos en O_2 , la reacción de tipo I es la principal en ambientes hipóxicos (Oschner, 1997; Jin y Zheng, 2011).



Nature Reviews | Cancer

Figura 1. Mecanismos de actuación de la TFD.
(Dolmans y col, 2003. Nat Rev Cancer 3:380-38)

En los tratamientos *in vivo* existen tres posibles vías (Agostinis y col, 2011; Allison y Moghissi, 2013) por las que la TFD puede destruir los tumores:

- Dañando directamente las células tumorales: cuando el FS se acumula en las células, al ser irradiado, genera ROS que desencadenan la muerte celular (Buytaert y col, 2007).
- Dañando la vascularización del tumor: los tumores necesitan gran cantidad de oxígeno y nutrientes para mantener su ritmo de crecimiento, por lo que pueden inducir la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) para incrementar su irrigación. Los tratamientos fotodinámicos pueden constreñir o bloquear estos vasos sanguíneos, provocando trombosis y hemorragias, lo que genera un déficit de oxígeno

en el tejido tumoral, que ralentiza el crecimiento del tumor o lo destruye. Este efecto puede potenciarse con el uso de inhibidores de la angiogénesis, para evitar la posible regeneración del tumor (Bhuvaneswari y col, 2009).

- Activando el sistema inmune contra las células cancerosas: como consecuencia del daño a la vasculatura tumoral, se produce una inflamación local y la liberación de citoquinas y de proteínas de respuesta a estrés. Todo esto provoca la invasión del tumor por parte de los leucocitos, que contribuyen tanto a la destrucción del tejido maligno como a la estimulación del sistema inmune, que puede reconocer las células patógenas y destruirlas (Brackett y Gollinck, 2011). Esta capacidad de estimular una respuesta inmune es una de las grandes ventajas de la TFD sobre otras terapias antitumorales, como la quimioterapia o la radioterapia, que provocan un efecto inmunosupresivo que deja al paciente expuesto a contraer otras enfermedades (Nowis y col, 2005; Brackett y Gollinck, 2011).

La contribución de cada uno de estos mecanismos en la destrucción del tumor depende, del tipo de FS utilizado, de la dosis de tratamiento, del tiempo transcurrido entre la administración del FS y la exposición a la irradiación y de la concentración de O₂ en el tejido (Agostinis y col, 2011).

Habitualmente, tras administrar el FS al paciente, se deja un intervalo de tiempo largo (más de 6 h) antes de irradiar, con el fin de que el FS sea eliminado de los tejidos sanos y se acumule en las células tumorales. Sin embargo, algunos estudios han puesto de manifiesto que reduciendo este intervalo de tiempo a 30 min, se consigue que el FS esté aún en los vasos sanguíneos del tumor, produciendo daño en la vasculatura, con la consiguiente necrosis y estimulación del sistema inmunitario (Chen y col, 2002).

En algunos tratamientos es conveniente producir esta respuesta necrótica en el tumor, que genere una inflamación local y la activación del sistema inmune. Por el contrario, en otros tipos de tumores, como es el caso de los cerebrales, conviene inducir una respuesta de tipo apoptótico, evitando la inflamación. Además, algunos trabajos apuntan a que la inducción de apoptosis mediante

TFD, también puede provocar una respuesta inmunológica (Garg y col, 2010). Por tanto, es posible modular la TFD, en función del tipo de respuesta que se desea alcanzar.

1.2. Fotosensibilizantes

El primer FS utilizado en estudios de TFD fue la hematoporfirina (Hp), caracterizada por Meyer-Benz a comienzos del siglo XX. A partir de este compuesto, Lipson y Baldes sintetizaron el derivado hematoporfirínico, HPD (Lipson y Baldes, 1960), hito considerado como el inicio de la TFD moderna. Estos autores observaron que este compuesto se acumula preferentemente en células tumorales, emitiendo fluorescencia roja al ser excitado con luz ultravioleta, por lo que se investigó su uso para fines diagnósticos (Lipson y col, 1961). En los años setenta, el grupo de Dougherty descubrió que el HPD irradiado con luz roja produce la regresión de tumores de mama en ratones (Dougherty y col, 1975). Durante los años ochenta, Dougherty analizó la estructura de la Hp, que se compone de una serie de porfirinas distintas, y también determinó que la transformación de la Hp en HPD por acetilación, da lugar a nuevas porfirinas (Dougherty, 1983). Posteriormente, caracterizó el compuesto activo del HPD, que está formado por dos porfirinas unidas por un enlace éter, denominando a este compuesto dihematoporfirin-éter (DHE) (Dougherty y col, 1984). Todos estos descubrimientos condujeron al lanzamiento del primer FS aprobado para su utilización clínica, un HPD comercializado como Photofrin® o PhotoBarr®. Este derivado es una mezcla, no bien definida, de más de 60 compuestos. Canadá fue el primer país en aplicarlo en 1993, y sigue siendo ampliamente utilizado para el tratamiento de tumores sólidos en numerosos países (Agostinis y col, 2011). Sin embargo, el HPD dista mucho de reunir las propiedades ideales (Piette y col, 2003; Allison y Moghissi, 2013) para su aplicación médica por las siguientes razones:

- Su composición química es poco conocida, lo que dificulta determinar su mecanismo exacto de actuación y su farmacocinética.
- Al estar formado por una mezcla de mono/di/oligómeros, es difícil reproducir su composición.
- Baja selectividad tumoral

- Provoca fotosensibilidad cutánea prolongada, lo que obliga a que los pacientes, una vez sometidos al tratamiento, deban evitar la exposición a la luz solar de 4 a 6 semanas.
- Escasa absorbancia en la región del rojo. Esto hace que sea necesario utilizar altas concentraciones de FS y dosis de luz elevadas en los tratamientos.

Estos inconvenientes han llevado a la búsqueda y caracterización de nuevos FSs más eficaces, con propiedades físicas, químicas y biológicas más adecuadas para su aplicación clínica. El objetivo de estas investigaciones es obtener drogas puras, con una elevada capacidad de absorción de luz roja, alta producción de formas activas de oxígeno, selectividad máxima para las células cancerosas y efectos secundarios mínimos (Bechet y col, 2008; Agostinis y col, 2011).

Actualmente, varios de estos FSs de segunda generación están aprobados para su utilización clínica, como es el caso del ácido-5-aminolevulínico (5-ALA) y su éster metilado (MAL), la temoporfin y la verteporfirina (Juarranz y col, 2008; Agostinis y col, 2011; Allison y Moghissi, 2013).

Tanto el 5-ALA como su éster metilado, comercializados con los nombres Levulan® y Metvix® respectivamente, son precursores de la protoporfirina IX, un FS endógeno asociado con ciertas formas de porfiria. Una vez dentro de las células los precursores se transforman, mediante el metabolismo celular, en la porfirina fotoactiva. Ambos fármacos se emplean principalmente en dermatología para tratar la queratosis actínica, carcinomas de células basales y la enfermedad de Bowen, aunque al ser porfirinas presentan muchos de los inconvenientes descritos para el HPD, en lo referente a sus propiedades relacionadas con la absorción de luz (Silva y col, 2008; Lee y Baron, 2011).

La temoporfin (*m*-THPC), comercializada como Foscan®, se emplea fundamentalmente para tratamientos paliativos de tumores de cabeza y cuello, pulmón, piel y cerebrales. El Foscan® posee un coeficiente de absorción en el rojo mayor que los FSs anteriormente mencionados, por lo que requiere dosis de tratamiento menores para conseguir un efecto terapéutico

comparable. Sin embargo, presenta diversas complicaciones asociadas, paradójicamente, a su elevado potencial fotodinámico.

Finalmente, la verteporfirina o benzoporfirina, comercializada como Visudyne®, está indicada para tratar la degeneración macular asociada a la edad y la neovascularización coroidal (Silva y col, 2008; Shah y col, 2009; Muehlmann y col, 2011).

Sin embargo, ninguno de estos FS cumple con todas las características ideales, siendo la caracterización de nuevos FS, uno de los objetivos de la TFD en la actualidad. Entre los FSs que actualmente se están estudiando, algunos de ellos ya en fase preclínica, se encuentran drogas tales como las porfirinas sintéticas, las clorinas, las bacterioclorinas, las purpurinas, las ftalocianinas, las naftalocianinas, las texafirinas y los porfíricos (Villanueva y col, 2003; O'Connor y col, 2009).

1.3. TFD y cultivos celulares

Una de las herramientas más empleadas para el estudio de los FSs antes de su aplicación *in vivo* son los cultivos celulares. Estos poseen una serie de ventajas con respecto a los estudios *in vivo*: menor complejidad, mayor control sobre el ambiente que rodea a las células y homogeneidad tanto a nivel morfológico como de composición, permitiendo profundizar más fácilmente en la comprensión de los procesos biológicos y bioquímicos que tienen lugar durante los tratamientos fotodinámicos.

En cultivos celulares, la respuesta celular que desencadenan los tratamientos fotodinámicos depende de varios factores (Peng y col, 1996; Villanueva y col, 2003; Cañete y col, 2009; Krammer y Verwanger, 2012):

1.3.1. Dosis de tratamiento

Viene dada por tres parámetros: la concentración del FS administrado, el tiempo de incubación en presencia del FS y la dosis de luz aplicada. Modificando estos tres valores es posible inducir distintas respuestas en las células.

- **Concentración del FS:** puede determinar el tipo de muerte celular que desencadena la TFD. Es el caso de la eritrosina, que en función de la

concentración administrada puede inducir distintas respuestas celulares: concentraciones bajas del FS producen una respuesta apoptótica, mientras que concentraciones altas causan necrosis (Garg y col, 2012). En otros casos, la concentración determina la cinética del proceso de muerte celular, como ocurre con el derivado del azul de metileno (MBD) en células V79: altas concentraciones de este FS producen una rápida muerte por apoptosis (3 h después de irradiar), mientras dosis más bajas también provocan la muerte por apoptosis aunque mucho más lenta (48 h después de irradiar) (Noodt y col, 1998).

- **Tiempo de incubación:** diversos trabajos realizados en células CV-1 tratadas con Photofrin®, han puesto de manifiesto que el tiempo de incubación tiene gran influencia sobre la respuesta que provoca la TFD. Con tiempos cortos de incubación, el FS se localiza principalmente en la membrana plasmática, induciendo un proceso fundamentalmente necrótico. Por otro lado, con tiempos más largos de incubación, el daño se localiza mayoritariamente en distintos orgánulos celulares, desencadenando un proceso de tipo apoptótico (Dellinger, 1996; Hsieh y col, 2003; Soriano y col, 2013).
- **Dosis de luz:** estudios realizados con los FSs ftalocianina de aluminio (AlPc) (Luo y Kessel, 1997) o la porfirina TMPyP (Villanueva y col, 1993), han mostrado que variando la dosis de luz administrada en la TFD, es posible modular el mecanismo de inactivación celular que se desencadena: con dosis de luz bajas, las células mueren por un proceso principalmente apoptótico, mientras que dosis más altas causan la inactivación por necrosis. Sin embargo, es necesario establecer la dosis adecuada de luz, puesto que no siempre se obtiene una mayor inactivación celular al irradiar con una luz de mayor intensidad. Es el caso de la tetra sulf-ftalocianina de aluminio (AlTSPc) o de zinc (ZnTSPc) en células UACC62. En ambos casos, la mayor eficacia de tratamiento se observa con una dosis de luz de 4,5 J/cm², mientras que aplicando dosis mayores se obtiene una menor inactivación celular, lo que se debe a un fenómeno conocido como *photobleaching*, que consiste en la degradación fotoquímica del FS debida a la propia irradiación (Maduray y col, 2011; 2012).

1.3.2. Tipo celular

Varios estudios han demostrado, que un mismo FS, aplicado en las mismas condiciones experimentales, puede provocar diferentes respuestas en función de la línea celular a la que se administra. Es el caso del tetrafenilporfenceno de Paladio (II) (TPPoPd), que en células HeLa causa la inactivación por apoptosis (Cañete y col, 2000; Villanueva y col, 2003), mientras que un tratamiento equiparable en células de la línea A-549, induce un proceso necrótico (Cañete y col, 2004). Por otro lado, el 5-ALA presenta un comportamiento similar, produciendo necrosis o apoptosis dependiendo de la línea celular que se trate (Wyld y col, 2001).

1.3.3. Localización subcelular

Es un factor determinante en la respuesta inducida por la TFD. Esto se debe a que el $^1\text{O}_2$ producido durante las reacciones fotodinámicas, posee una vida media inferior a 320 nanosegundos y una capacidad de difusión entre 10 y 55 nm, por lo que únicamente es capaz de interactuar con las estructuras celulares más cercanas al lugar donde se acumula el FS (Moan y Berg, 1991; Dysart y col, 2005). La localización subcelular viene dada por una serie de características estructurales del FS, como la carga o el grado de hidrofobicidad y de asimetría de la molécula. El mecanismo de vehiculización y la vía de internalización de los FSs en la célula, también puede influir sobre la localización intracelular del compuesto. Entre las estructuras celulares que pueden ser diana de la TFD están:

- **Mitocondrias:** en estos orgánulos reside el sistema de regulación de la apoptosis intrínseca, por lo que los FSs que se localizan en ellas pueden provocar la inactivación celular por esta vía (Moor, 2000; Kessel y col, 2002; Piette y col, 2003; Garg y col, 2012; Hoi y col, 2012), aunque en algunos casos pueden iniciar un proceso autofágico (Kessel y col, 2006; Sasnauskiene y col, 2009a; b). Todos estos FSs suelen provocar una respuesta más rápida y eficaz que aquellos FSs que se localizan en otras estructuras celulares (Oliveira y col, 2011).
- **Membrana plasmática:** en ella se acumulan algunos FSs hidrofóbicos, como el meso-tetrafenilporfenceno (TPP) (Cañete y col, 1998) o la AIPc

(Moor, 2000). Ésta última provoca la activación de fosfolipasas (PLA 2 y C), involucradas en diversas rutas capaces de desencadenar la apoptosis. Por otro lado, el Photofrin® también puede acumularse en la membrana plasmática con tiempos cortos de incubación, induciendo ciertos eventos apoptóticos como la activación de la caspasa-3 o la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, aunque el proceso apoptótico no puede completarse debido a la ruptura de la membrana plasmática, por lo que no se observan otras características clásicas de esta ruta, como la translocación de la fosfatidilserina o la fragmentación de la cromatina, resultando una morfología final de tipo necrótico (Hsieh y col, 2003).

- **Lisosomas:** muchos FSs se localizan en estos orgánulos, como el azul de metileno (Yao y Zhang, 1996; Oliveira y col, 2011), la N-aspartil clorina e6 (NPe6) o la tetra (4-sulfonatofenil)-porfina (TPPS₄). Algunos de estos FSs se acumulan en la membrana lisosomal, como es el caso de la NPe6, mientras que otros lo hacen en el espacio interno del orgánulo, como la TPPS₄. En el primer caso, la membrana lisosomal pierde su integridad inmediatamente después del tratamiento fotodinámico, liberando al citoplasma las proteasas lisosomales, que son inactivadas en su mayoría por inhibidores endógenos y por el pH más básico del citoplasma, aunque parte de estas enzimas, como las catepsinas, pueden llegar a interaccionar con moléculas proapoptóticas como Bid, induciendo un proceso apoptótico (Reiners y col, 2002; 2010). Por el contrario, los FSs que se acumulan en el espacio interno del orgánulo, provocan la fotoinactivación de las enzimas lisosomales antes de que la integridad de la membrana lisosomal se pierda, por lo que las enzimas liberadas al citoplasma están inactivas en su totalidad. En este caso, el FS se libera al citoplasma y se relocaliza en otros orgánulos no lisosómicos, desde donde se desencadena la respuesta fototóxica (Reiners y col, 2010).
- **Retículo endoplasmático:** en él residen los mecanismos de regulación de la homeostasis del calcio, implicado en el control de la muerte celular, de modo que algunos FSs que se localizan en el RE, como el caproniloxi-tetrakis metiloxietil porficeno (CPO), pueden causar una liberación de Ca²⁺ capaz de desencadenar la apoptosis por la vía intrínseca. Sin embargo,

dicha liberación no es suficiente ni imprescindible para inducir la muerte celular. La principal causa de desencadenar la apoptosis, en este caso, es la degradación de Bcl-2, una proteína antiapoptótica localizada tanto en mitocondrias como en el RE (Kessel y col, 2005).

- **Aparato de Golgi:** también puede desencadenar la muerte celular, siendo diana de FSs como la ftalocianina de Zinc (II) (ZnPc) (Fabris y col, 2001; Cristobal y col, 2006), que bajo determinadas condiciones experimentales, se localiza en dicho orgánulo. Algunos estudios han mostrado que en algunas líneas celulares como HeLa, el aparato de Golgi es capaz de actuar como un señalizador proapoptótico, en respuesta al estrés oxidativo producido por los tratamientos fotodinámicos (Mancini y col, 2000).

Además, el citoesqueleto puede ser diana secundaria de la TFD. Algunos FS como la ALPc alteran el citoesqueleto de microtúbulos (MTs), provocando la despolimerización de estos (Berg y Moan, 1997). Otros FSs como la hipericina (HYP) (Piette y col, 2003) o TPPoPd (Cañete y col, 2000), inducen alteraciones del ciclo celular, que llevan a que la célula entre en apoptosis y sea eliminada, manteniendo la homeostasis celular.

También los microfilamentos de actina se pueden ver afectados por los tratamientos fotodinámicos. Dado que los microfilamentos están implicados en la adhesión celular al sustrato, algunos FS como el 5-ALA, a concentraciones subletales inducen cambios morfológicos e impiden que las células se peguen al sustrato o se despeguen de éste al tripsinizarlas (Uzdensky y col, 2005). Esta alteración de la adhesión celular puede ser aprovechada para disminuir los procesos de metástasis en un tumor. El TPPoPd también causa una rápida pérdida de las fibras de estrés en células A-549, lo que provoca que se despeguen del sustrato (Cañete y col, 2004).

1.3.4. Vehiculización

A grandes rasgos, los FSs se pueden dividir en dos tipos, hidrofílicos e hidrofóbicos. Los hidrofílicos es posible disolverlos fácilmente en medios acuosos, tales como tampones, medios de cultivo o directamente en agua, lo que facilita su administración a las células. Es el caso del azul de toluidina, el

azul de metileno (Cañete y col, 1993) o el derivado tetrasulfonado de la ZnPc (ZnTSPc) (Maduray y col, 2011).

Sin embargo, muchos FSs son hidrofóbicos, por lo que al disolverlos en medios acuosos, presentan fuertes interacciones entre sus moléculas, lo que altera sus propiedades fotofísicas (menor producción de $^1\text{O}_2$), químicas (menor o nula solubilidad) y biológicas (menor capacidad de penetración en las células) (Jin y Zheng, 2011). Para evitar estos problemas, se han desarrollado numerosos sistemas de vehiculización, que aportan distintas ventajas, como la capacidad de transportar mayores cantidades de FS sin alterar su actividad, evitando su degradación o eliminación prematura de la circulación sanguínea y facilitando la acumulación selectiva en el tejido diana o la interacción del FS con las células (Jin y Zheng, 2011; Muehlmann y col, 2011).

Algunas de las estrategias de vehiculización empleadas son:

- El uso de solventes orgánicos, como el etanol (Vargas y col, 2004) o el dimetilsulfóxido (DMSO) (Chin y col, 2008), que al ser miscibles en agua permiten que el FS disuelto en estos compuestos se diluya en medios acuosos, conservando mejor sus propiedades físico-químicas. Sin embargo, el uso de estos solventes acarrea cierta toxicidad celular, que hay que tener en cuenta a la hora de utilizarlos en TFD.
- Añadir al medio acuoso moléculas capaces de estabilizar al FS, como por ejemplo la albúmina sérica, reduciendo de este modo la agregación de FSs hidrofóbicos tales como la ZnPc, aunque sus propiedades fotofísicas empeoran si se comparan con el FS disuelto en solventes orgánicos (Alarcón y col, 2009).
- Conjuguar los FSs con anticuerpos específicos contra las células tumorales (van Dongen y col, 2004) o incluirlos dentro de nanopartículas modificadas con ligandos con afinidad por las células cancerosas (Vargas y col, 2004; Pegaz y col, 2005; Rana y col, 2007; Master y col, 2013). Estas modificaciones, además de incrementar la estabilidad de los FS en soluciones acuosas, también mejoran su especificidad de localización.

Además de las anteriormente mencionadas, una de las técnicas más utilizadas para vehiculizar FSs son los liposomas, unas pequeñas vesículas artificiales formadas por una bicapa lipídica con un interior acuoso (Fig. 2).

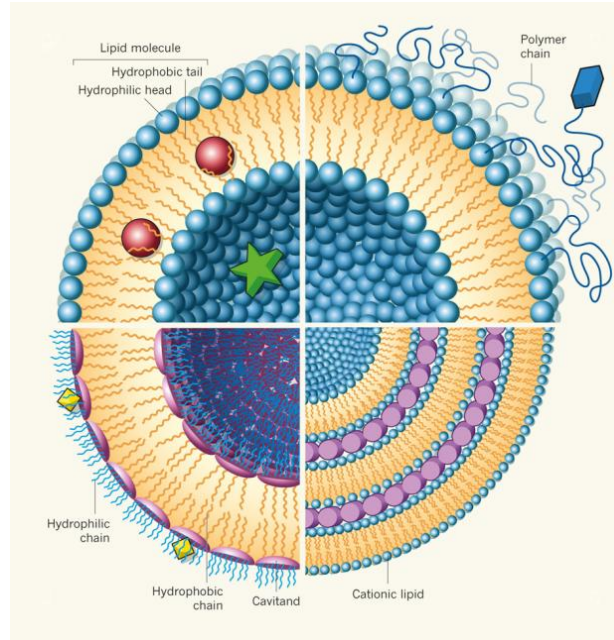


Figura 2. Esquema de un liposoma. (Safinya y Ewert, 2012. Nature 489:372–374)

Los liposomas se acumulan preferentemente en las células tumorales, gracias a que éstas sobreexpresan receptores de membrana, que reconocen los liposomas y los introducen en el citoplasma. Entre estos receptores destacan los receptores de partículas LDL, que se encuentran en altas cantidades en la superficie de las células tumorales, dado que por su elevada tasa de proliferación, estas células necesitan un gran aporte de colesterol para sintetizar sus membranas (Derycke y de Witte, 2004).

Entre las principales ventajas de los liposomas (Jin y Zheng, 2011; Muehlmann y col, 2011) se cuentan que:

- Son biocompatibles.
- Es posible introducir en su interior tanto FSs hidrofílicos, que quedan en el espacio interno acuoso del liposoma; como hidrofóbicos, que se incluyen en la bicapa lipídica de la vesícula. De este modo los FSs se mantienen en estado monomérico, evitando su agregación y mejorando su rendimiento fotodinámico.

- Las moléculas incorporadas en su interior están protegidas de las condiciones externas, evitando así la posible degradación o alteración de sus propiedades.
- Su tamaño, carga y propiedades superficiales son fácilmente modificables, lo que permite dirigir fármacos contra células concretas, e incluso, compartimentos celulares específicos.

Una forma de alterar las propiedades y lugar de acumulación de los liposomas, es mediante la conjugación con diversos ligandos de membrana (Jin y Zheng, 2011; Muehlmann y col, 2011). Algunos de estos ligandos son:

- **Anticuerpos:** al igual que ocurría con los FSs libres, es posible utilizar anticuerpos capaces de reconocer alguna proteína específica de las células tumorales, para dirigir los liposomas contra un tipo celular tumoral específico (Sofou y Sgouros, 2008; Torchilin, 2010). Es el caso de HER2, una proteína sobreexpresada en la membrana de algunas células cancerígenas, por lo que conjugar liposomas con anticuerpos anti-HER2, dirige estos liposomas contra las células tumorales (Park y col, 2001).
- **Folato:** los receptores de folato pueden estar sobreexpresados en células cancerosas, de modo que conjugando folato con liposomas, es posible dirigirlos preferentemente al tumor, penetrando en las células a través de endocitosis mediada por receptores de folato (García-Díaz y col, 2011a; Kolhatkar y col, 2011).
- **Transferrina:** al igual que el folato, muchas líneas celulares tumorales sobreexpresan receptores de transferrina en su membrana, para conseguir el aporte extra de hierro necesario para sostener su elevada tasa de proliferación. Por tanto, conjugar liposomas con transferrina o con anticuerpos contra sus receptores, es otra interesante estrategia para dirigir los liposomas (Hatakeyama y col, 2004; Kolhatkar y col, 2011).
- **Péptidos:** también es posible funcionalizar los liposomas con secuencias peptídicas, que tienen una menor inmunogenicidad y tamaño que los anticuerpos, lo que permite obtener liposomas con menor peso molecular. Un ejemplo son los liposomas cargados con el derivado de la benzoporfirina (BPD-MA), recubiertos con polietilenglicol (PEG) conjugado

con el pentapéptido APRPG. Estos liposomas se acumulan con mayor especificidad en las células endoteliales de la vasculatura del tumor, consiguiendo un efecto antiangiogénico mayor con una menor dosis de tratamiento (Ichikawa y col, 2005).

- **Nanopartículas:** otra estrategia para dirigir FSs, así como otras moléculas incluidas en liposomas hacia un determinado tipo celular, consiste en combinar los liposomas con nanopartículas magnéticas, que permite mediante campos magnéticos continuos, dirigir los liposomas cargados con el FS y las nanopartículas contra un tejido específico (Al-Jamal y Kostarelos, 2007; Master y col, 2013).

Por tanto, los liposomas son una herramienta muy versátil y con gran potencial para la vehiculización de moléculas terapéuticas.

2. Muerte celular

Durante su ciclo de vida, las células eucariotas se multiplican, sobreviven durante un tiempo determinado y finalmente mueren. La vida media de una célula varía en función de la especie a la que pertenezca dicha célula. Por ejemplo, los eritrocitos de cerdo tienen una vida media de 63 días, mientras que en caballo es de 140 días. También existen variaciones dentro de un mismo organismo en función del tipo celular, de modo que las células epiteliales del intestino delgado tienen una vida media de 3 a 5 días, y las células cutáneas de 20 a 25 días. Otras células, como las del músculo cardíaco o las neuronas no se renuevan en toda la vida del individuo. Para adaptar su ciclo vital a las necesidades del organismo, las células presentan una serie de mecanismos conocidos como muerte celular programada, a través de los que las células se autoeliminan en determinadas condiciones.

A nivel evolutivo, los organismos han desarrollado distintos mecanismos de muerte celular con diversos objetivos. Mientras en organismos unicelulares, los mecanismos de muerte celular programada permiten adecuar el número de individuos a la cantidad de nutrientes disponibles, en organismos multicelulares, la muerte celular programada juega diversos papeles relacionados con el desarrollo embrionario y neuronal, el control de la homeostasis celular y la eliminación de células dañadas o infectadas por patógenos (Pereira y Amarante-Mendes, 2011; Strasser y col, 2011; Ulukaya y col, 2011).

El concepto de muerte celular programada surge a mitad de los años 60 (Kerr, 1965; Lockshin y Williams, 1965). Desde su descubrimiento, se ha tratado de establecer una clasificación de los distintos tipos de inactivación celular, en base a las características morfológicas propias de cada ruta de muerte. En 1973, Schweichel y Merker describieron tres tipos de morfologías distintas en células muertas de tejidos prenatales (Schweichel y Merker, 1973): una muerte celular de tipo I (apoptosis), de tipo II (autofagia) y de tipo III (necrosis), que constituyen los tres principales mecanismos de muerte desde un punto de vista morfológico (Kroemer y col, 2005). Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que procesos con unas características morfológicas muy

similares, presentan una gran heterogeneidad bioquímica y funcional (Galluzzi y col, 2007; Green y col, 2009; Kroemer y col, 2009).

Por este motivo, diversos autores han tratado de desarrollar una clasificación basada en criterios de tipo bioquímico, pero la elaboración de dicha clasificación conlleva varios problemas. Por un lado, una ruta de muerte celular asociada a un proceso bioquímico determinado, puede tener lugar en ausencia de dicho proceso. Es el caso de la apoptosis, que se ha asociado tradicionalmente a la activación de caspasas, aunque numerosos trabajos han puesto de manifiesto que pueden tener lugar procesos apoptóticos independientes de caspasas (Chipuk y Green, 2005; Kroemer y Martin, 2005). Otro ejemplo es la translocación de fosfatidilserina (PS) de la monocapa lipídica interna de la membrana plasmática, a la monocapa lipídica externa, evento que es un marcador clásico de apoptosis temprana, aunque hay casos en que se producen procesos apoptóticos en ausencia de este fenómeno (Martin y col, 1995; Qu y col, 2007).

Otro problema a la hora de establecer dicha clasificación, es el hecho de que fenómenos considerados específicos de un tipo de muerte celular, pueden tener lugar cuando se producen otras vías de muerte distintas. Por ejemplo, la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno tiene lugar en numerosos casos de apoptosis (Nicotera y col, 1999; Kroemer y col, 2007), pero también se ha relacionado con procesos de necrosis regulada (Vandenabeele y col, 2010). Lo mismo ocurre con la translocación de la PS, que además de producirse en procesos apoptóticos, tiene lugar en etapas tempranas de otras rutas no apoptóticas (Wang y col, 2009; Mihalache y col, 2011).

Por último, es posible que se produzca la activación de procesos bioquímicos asociados a la muerte celular, a niveles subletales o transitorios que no llevan a la eliminación de la célula. Es el caso de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP), que cuando ocurre de una forma masiva constituye un punto de no retorno en la apoptosis intrínseca (Kroemer y col, 2007). Sin embargo, existen procesos no relacionados con la muerte celular, como la diferenciación de megacariocitos y granulocitos, en los que se produce una MOMP limitada a una fracción de la mitocondrias de la célula,

desencadenando la activación localizada de la caspasa-3 sin que se produzca muerte celular (Galluzzi y col, 2008).

Por todo esto, no es posible clasificar un tipo de muerte celular en base a un único rasgo o característica molecular, siendo necesaria una valoración de los aspectos morfológicos y bioquímicos del proceso antes de aventurar una conclusión. En términos generales, los criterios morfológicos siguen siendo el mejor método para determinar qué tipo de ruta de muerte celular tiene lugar en una célula, puesto que permiten distinguir de una forma bastante precisa entre los tres principales mecanismos de muerte celular (Kroemer y col, 2005; Rello y col, 2005; Wlodkowic y col, 2011). Una vez determinada la ruta de muerte, los estudios bioquímicos y moleculares nos permiten caracterizar los mecanismos precisos a través de los que se produce la inactivación celular (Galluzzi y col, 2012).

La clasificación propuesta en 2012 por el comité de nomenclatura de muerte celular, elaborado por la revista "Cell death and differentiation", distingue tres tipos de muerte celular y una serie de variantes cuya clasificación aún no está muy clara (Galluzzi y col, 2012).

2.1. Apoptosis

Se trata del mecanismo predominante de muerte celular programada en muchos organismos y el más estudiado. Los aspectos ultraestructurales de este proceso fueron descritos en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie (Kerr y col, 1972). A nivel morfológico se caracteriza por:

- Fragmentación de la cromatina en cuerpos apoptóticos.
- Contracción del citoplasma.
- Degradación del ADN en fragmentos oligonucleosomales.
- Conservación a corto plazo de la integridad de los orgánulos y de la membrana plasmática.
- En los procesos apoptóticos *in vitro*, las células apoptóticas al no ser endocitadas por los fagocitos, acaban perdiendo la integridad de la membrana (Kerr y col, 1995; Majno y Joris, 1995).

La apoptosis se puede dividir en tres fases: iniciación, efectora y degradación (Hail y col, 2006). La fase de iniciación es muy dependiente tanto del tipo celular como del estímulo inductor. Esta fase puede influir en la eficacia de las dos fases siguientes. En la fase efectora se activan las proteasas, nucleasas y demás efectores que intervienen en la fase de degradación. Estas dos últimas fases son las que promueven los cambios estructurales propios de la apoptosis.

La fase de iniciación comienza cuando la célula recibe el estímulo que desencadena la apoptosis. Estos estímulos, en función de donde provengan, permiten clasificar la apoptosis en dos categorías:

2.1.1. Apoptosis desencadenada por la vía mitocondrial o intrínseca

Es inducida por señales de estrés intracelular, tales como el daño del ADN, el estrés oxidativo o la acumulación de proteínas mal plegadas. Pese a que las rutas que tienen lugar en esta vía son muy variadas, todas coinciden en que la mitocondria juega un papel central (Kroemer y col, 2007). Esta vía está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2, proteasas y otros agentes como la ceramida (Ulukaya y col, 2011) o el ion Ca^{2+} (Orrenius y col, 1992).

Los miembros de la familia Bcl-2 se pueden dividir en antiapoptóticos: A1, Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 y Bcl-W; y proapoptóticos: Bax, Bad, Bok, Bid, Bim, Bik, Bmf, Noxa y Puma (Pereira y Amarante-Mendes, 2011). En la célula viva, existe un equilibrio entre los factores pro y antiapoptóticos (Strasser y col, 2011). En respuesta a un estímulo de estrés, como puede ser el daño en el ADN, p53 lo reconoce y detiene el ciclo celular para tratar de repararlo. Si la reparación no es posible, p53 interacciona con miembros de la familia Bcl-2, rompiendo el equilibrio a favor de los factores proapoptóticos (Ulukaya y col, 2011). Entonces, Bax y Bad inducen la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, provocando la MOMP (Fig. 3).

La MOMP tiene una serie de consecuencias letales para la célula como: (i) la disipación del potencial de membrana, lo que bloquea la síntesis de ATP; (ii) la liberación de varias moléculas tóxicas desde el espacio mitocondrial interno al citoplasma, como el citocromo C (cit C), factores inductores de la apoptosis (IAF) o la endonucleasa G (endoG); (iii) la inhibición de la cadena respiratoria,

lo que resulta en un incremento de las ROS, que a su vez producen un efecto bucle que incrementa la señal proapoptótica (Fig. 3) (Kroemer y col, 2007).

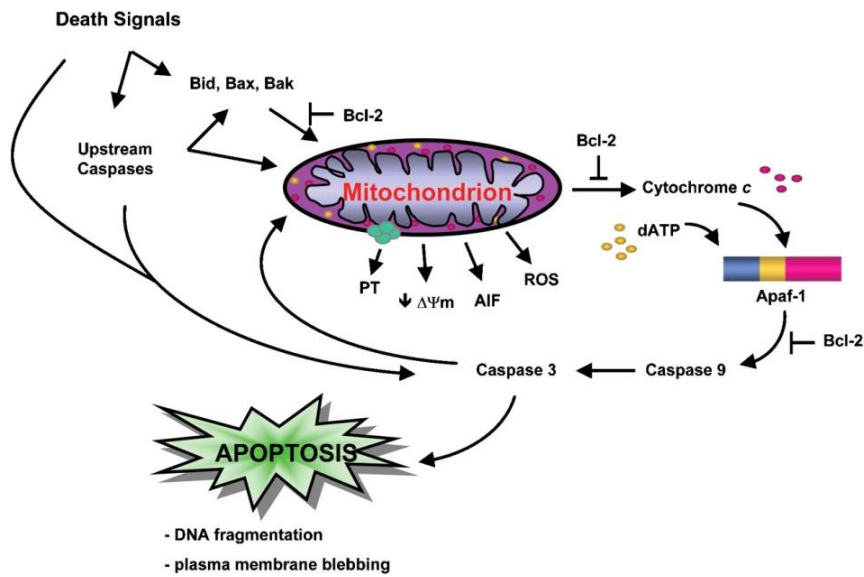


Figura 3. Esquema de los mecanismos moleculares de la apoptosis intrínseca (Alimonti y col, 2003. J Gen Virol 84:1649-1661)

Al liberarse el cit C al citoplasma, se une a APAF1 y dATP, formando el apoptosoma, que activa la cascada caspasa-9→caspasa-3. La caspasa-3 trunca el inhibidor de la DNasa activada por caspasa (ICAD), liberando la DNasa CAD, que produce la fragmentación nucleosomal del ADN. Este evento no es exclusivo de la apoptosis mediada por caspasas, puesto que otras proteasas no-caspasas también pueden activar la cascada ICAD→CAD, induciendo la fragmentación nucleosomal del ADN (Sharif-Askari y col, 2001).

2.1.2. Apoptosis dependiente de receptor de muerte o extrínseca

Es inducida por señales extracelulares de estrés y requiere la actuación de receptores de membrana específicos de la superfamilia TNFR (Receptores del Factor de Necrosis Tumoral). Se desencadena al unirse un ligando como FASL o TNF a a su correspondiente receptor de muerte celular (Wajant, 2002; Schutze y col, 2008). También existen otros receptores, llamados de dependencia, que solo inducen apoptosis cuando la concentración de un determinado ligando cae por debajo de un valor determinado (Mehlen y Bredesen, 2011).

Los receptores de muerte son proteínas transmembrana que se caracterizan por tener un dominio intracelular, denominado dominio de muerte (DD), que

en respuesta a la unión del ligando adecuado, interacciona con una serie de proteínas adaptadoras formando el Complejo Inductor de Señalización de Muerte (DISC) (Wilson y col, 2009), que recluta y activa a la caspasa 8 o 10, que a su vez pueden activar a la caspasa efectora 3 (Galuzzi y col, 2012), o bien truncan la proteína Bid dando lugar a tBid, que interacciona con la mitocondria y produce la MOMP, liberando distintas proteínas proapoptóticas al citoplasma (Fig. 4) (Scaffidi y col, 1998; Galuzzi y col, 2012).

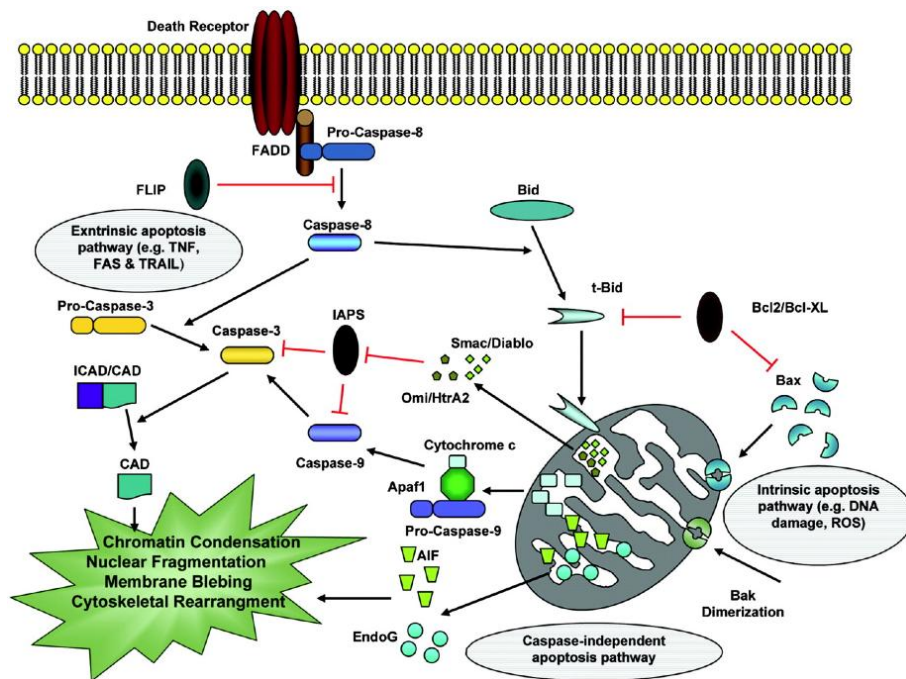


Figura 4. Esquema de los mecanismos moleculares de la apoptosis extrínseca (Ghavami y col, 2009. J Med Genet 46:497-510)

En las dos rutas apoptóticas anteriores, hemos visto que las caspasas juegan un papel determinante. Las caspasas son una familia de proteínas **cisteín-aspartato-proteasas** que se encuentran presentes en la mayoría de las células de los mamíferos (Amarante-Mendes y Green, 1999; Kumar, 2007). Existe más de una docena de caspasas, de las que solo están implicadas en procesos apoptóticos las caspasas -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 y -12 (Ulukaya y col, 2011). Se localizan principalmente en el citoplasma en forma inactiva y muchas de ellas también están implicadas en procesos relacionados con el mantenimiento de

la homeostasis celular, como la diferenciación, la proliferación o la producción de citoquinas (Launay y col, 2005).

En lo referente a su papel en la muerte celular, las caspasas se pueden dividir en iniciadoras (caspasas -8, -9 y -10) y efectoras (-3, -6 y -7). En condiciones fisiológicas normales, las caspasas están en forma inactiva como procaspasas. Durante la apoptosis, las caspasas iniciadoras reconocen el estímulo de muerte y se activan por dimerización, proceso en el que intervienen distintos complejos multiméricos, tales como el apoptosoma o el DISC. Posteriormente, las caspasas iniciadoras activan a las efectoras (Creagh y col, 2003; Pop y Salvesen, 2009).

Una vez activado, cada tipo de caspasa tiene una serie de sustratos específicos que es capaz de cortar, siempre detrás de un residuo de aspartato. Estos sustratos pueden ser proteínas estructurales como las laminas, la actina o la fodrina, o bien moléculas de señalización como algunas kinasas o la ciclina A (Ulukaya y col, 2011). Algunas de las consecuencias de ésta capacidad proteolítica de las caspasas son: (i) la degradación de factores endógenos antiapoptóticos, como Bcl-2 o Bcl-XL, que al ser cortados no solo pierden su potencial antiapoptótico, sino que favorecen la MOMP (Reed y col, 1998); (ii) los cambios morfológicos, provocados por la ruptura de las laminas nucleares o de proteínas del citoesqueleto como la gelsolina (Hengartner, 2000); (iii) la fragmentación del ADN, al truncar ICAD liberando la DNasa CAD (Enari y col, 1998).

La actividad de las caspasas está regulada además por otros factores, como la producción de ROS: la producción anómala de ROS puede inactivar las caspasas al oxidar los residuos de cisteína de sus sitios activos (Chandra y col, 2000). También determinados factores genéticos o epigenéticos pueden afectar a la expresión de las caspasas. Es el caso de las células MCF-7, que carecen de caspasa-3 debido a una mutación en el gen que la codifica (Janicke y col, 1998) o de la caspasa-8 en células de neuroblastoma, en las que está inhibida por metilación del ADN (Teitz y col, 2000).

2.1.3. Apoptosis independiente de caspasas

Tradicionalmente se ha considerado que la activación de caspasas era un requisito imprescindible de los procesos apoptóticos. Sin embargo, diversos estudios realizados con inhibidores químicos y génicos de las caspasas, han puesto de manifiesto que pueden tener lugar procesos apoptóticos independientes de caspasas (Chipuk y Green, 2005; Kroemer y Martin, 2005). En estos casos intervienen proteasas no-caspasas como las catepsinas, calpaínas y granzimas (Johnson, 2000):

- Las catepsinas son un tipo de proteasas, localizadas en los lisosomas y/o endosomas, que durante la apoptosis se translocan al citoplasma. Son capaces de cortar diversos sustratos y su activación se relaciona con diversos eventos apoptóticos tales como la MOMP, la condensación de la cromatina, la degradación de la matriz extracelular, la activación de procaspasas o la translocación de PS de la monocapa interna de la membrana plasmática a la externa, en fases tempranas de la apoptosis (Hail y col, 2006).
- Las calpaínas son una familia de cisteín-proteasas que se localizan en el citoplasma. Se han asociado tanto con procesos apoptóticos (Johnson, 2000; Takano y col, 2005), como con ciertas enfermedades como el Alzheimer (Nixon y col, 1994) o el Parkinson (Mouatt-Prigent y col, 1996), en las que se observa una actividad anómala de las calpaínas. Estas proteasas se activan en respuesta a incrementos del Ca^{2+} intracelular (Johnson, 2000) y su actividad es sensible a la oxidación de una forma similar a lo que ocurre con las caspasas.
- Las granzimas son un tipo de serina-proteasas capaces de cortar el extremo carboxi-terminal de los residuos de aminoácidos, por lo que su especificidad es baja. Son secretadas por exocitosis para atraer a las células natural killer, que inducen apoptosis en la célula que las segrega (Johnson, 2000; Cullen y col, 2010). Su actividad se ha relacionado con la fragmentación del ADN independiente de caspasas, la MOMP y la externalización de PS (Heibein y col, 2000).

Además de estas proteasas, existen otras proteínas no proteasas que intervienen en la apoptosis independiente de caspasas, son los factores inductores de la apoptosis (IAF), un grupo de flavoproteínas que una vez liberadas desde la mitocondria al producirse la MOMP, se translocan al núcleo donde inducen la condensación de la cromatina y la fragmentación a gran escala del ADN (Hong y col, 2004). Su liberación no es dependiente de caspasas, como diversos trabajos han puesto de manifiesto (Cregan y col, 2002; Wang y col, 2002). Los IAF no tienen actividad DNasa por si solos, por lo que necesitan reclutar o activar a otras endonucleasas, como la ciclofilina A (Cande y col, 2004) o la endonucleasa G mitocondrial (endoG), que colaboran con los IAF para promover la degradación del ADN (Wang y col, 2002).

En los organismos multicelulares, una vez la célula muere por apoptosis, sus restos son endocitados por los fagocitos. Para ello las células apoptóticas presentan una serie de señales, de las que la más conocida es la translocación de la PS (Martin y col, 1995; 1996). Este reconocimiento permite mantener la homeostasis celular, estimulando la producción de sustancias anti-inflamatorias y evitando la liberación de citoquinas proinflamatorias (Pereira y Amarante-Mendes, 2011).

2.1.4. TFD y apoptosis

Diversos FSs son capaces de inducir apoptosis en distintas líneas celulares. Es el caso de aquellos que se acumulan en la mitocondria y el retículo endoplasmático como Pc4, que al fotoactivarse degrada a diversas proteínas antiapoptóticas localizadas en estos orgánulos, como Bcl-2 o Bcl-XL, provocando un descenso de los niveles de éstas, lo que induce la activación de la caspasa-3 y la entrada de la célula en apoptosis intrínseca (Xue y col, 2003). Bax y Bad también intervienen en la apoptosis intrínseca inducida por TFD. Diversos trabajos apuntan a que aquellas células carentes de éstas proteínas proapoptóticas, son resistentes a la apoptosis inducida por tratamientos fotodinámicos con Pc4 (Usuda y col, 2002) o HYP (Buytaert y col, 2006a; b).

Otros FSs como NPe6 (Reiners y col, 2002; 2010) o Pc181 (Chiu y col, 2010), que se acumulan mayoritariamente en los lisosomas, también son capaces de inducir apoptosis intrínseca, aunque en este caso son proteínas como Bid o las catepsinas las responsables de dirigir el proceso, provocando la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas -3 y -9.

Por otro lado, FSs como el hexaminolevulinato (Furre y col, 2006) o el derivado de las ftalocianinas Poll (Vittar y col, 2010), inducen procesos apoptóticos independientes de caspasas, en los que no se observa liberación del citocromo c, estando mediado el mecanismo por la translocación de IAF al núcleo.

Finalmente, pese a que está descrito que algunos FSs como la HYP (Ortel y col, 2009) o Pc4 (Ahmad y col, 2000), son capaces de inducir apoptosis extrínseca en determinados tipos celulares, en líneas generales esta vía no es habitual en TFD (Buytaert y col, 2007).

2.2. Necrosis

Tradicionalmente, la necrosis se ha considerado un mecanismo de muerte celular pasivo y accidental, sin ningún tipo de regulación (Hail y col, 2006). A nivel morfológico se caracteriza por:

- Incremento del volumen celular (oncosis).
- Disrupción de los orgánulos.
- Aparición de burbujas (*blebs*) en la membrana plasmática, que finalmente pierde su integridad.

Otra característica de los procesos necróticos es que producen una fuerte respuesta inflamatoria (Li y col, 2001), que se debe a la liberación, causada por la ruptura de la membrana plasmática, de unos componentes intracelulares llamados alarminas (Green y col, 2009; Poon y col, 2010).

Sin embargo, recientes estudios han puesto de manifiesto que la necrosis puede tener lugar de una manera regulada, jugando un importante papel a nivel fisiológico y patológico (Hitomi y col, 2008; Cho y col, 2009; He y col, 2009; Zhang y col, 2009). El termino necrosis regulada engloba distintos mecanismos, que se producen en respuesta a agentes de diversa naturaleza, y en los que

participan diferentes rutas de señalización y moléculas, algunas de las cuales también intervienen en procesos apoptóticos o autofágicos.

Uno de los desencadenantes de la necrosis regulada más estudiados, es el daño en el ADN inducido por agentes alquilantes (Zong y col, 2004). Estos agentes producen un tipo de necrosis regulada conocida como parthanatos (Wang y col, 2009). En respuesta a estos estímulos, la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa-1 (PARP-1), un enzima encargada de reparar el ADN dañado, sufre una activación desproporcionada generando gran cantidad de polímeros poli-(ADP-ribosa) y consumiendo todo el NAD⁺ y el ATP celular, lo que provoca un déficit energético que conduce a la muerte celular (Fig. 5). En este proceso intervienen también otras moléculas relacionadas con la apoptosis como la oxidoreductasa AIF, Bax o las calpaínas, lo que dificulta la discriminación entre ambos mecanismos (Moubarak y col, 2007; Baritaud y col, 2010). Esta ruta de muerte celular se ha asociado con ciertas patologías neurológicas, como la enfermedad de Parkinson o la isquemia (Wang y col, 2009).

Otro mecanismo de necrosis regulada es la necroptosis (Fig. 5). Se ha observado que cuando se inhiben las caspasas, especialmente la caspasa-8, ya sea de forma química o génica, la unión de determinados ligandos a receptores de muerte como TNFR1, puede disparar la activación de este proceso necrótico regulado (He y col, 2009; Zhang y col, 2009). Este mecanismo está mediado por un complejo proteico, el necrosoma, formado por dos kinasas, RIP-1 y -3.

El necrosoma se forma ante determinados estímulos y es capaz de interactuar y potenciar la actividad de ciertas enzimas bioenergéticas, tales como la glutamato-amonio ligasa (GLUL) o la glutamato deshidrogenasa (GLUD-1), incrementando el metabolismo energético, y por tanto la producción de ROS. Este incremento de los niveles de ROS ha sido descrito como mecanismo ejecutor de la necroptosis en algunos tipos celulares. Además, la permeabilización de la mitocondria también se ha relacionado con esta ruta de muerte, aunque aún no se conoce exactamente como interviene, si bien parece que la liberación al citoplasma de la ciclofilina D y de la adenina nucleótido translocasa, tienen un papel importante en el proceso

(Christofferson y Yuan, 2010; Galluzzi y col, 2012; Yoshida y col, 2012). Dado que generalmente este proceso solo ocurre en células que carecen de caspasa-8, la necroptosis ha sido propuesta por diversos autores como un mecanismo de seguridad, para asegurar la eliminación de aquellas células dañadas en las que la apoptosis está inhibida, aunque en ciertos tipos celulares puede ocurrir independientemente de que las caspasas estén inhibidas (Vanlangenakker y col, 2012).

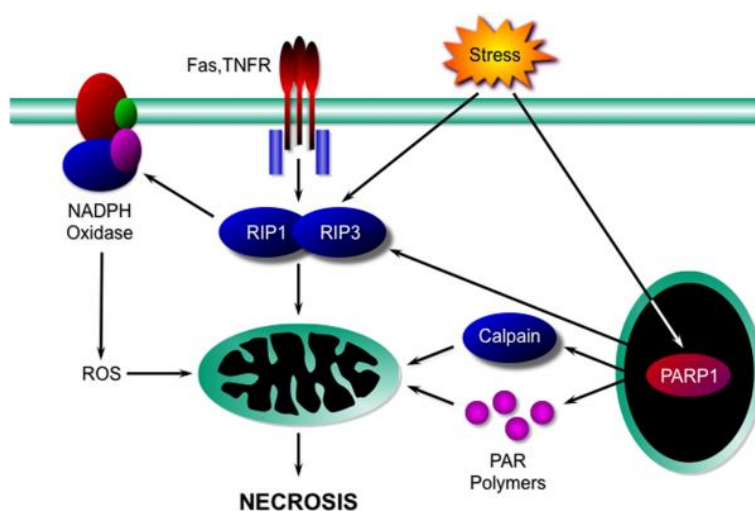


Figura 5. Esquema de los mecanismos moleculares de la necroptosis y el parthanatos.
(info.agscientific.com/advancing-biochemical-research)

Otros agentes como el estrés oxidativo, la exposición a ciertos patógenos o el incremento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , también son capaces de producir una respuesta necrótica regulada en las células (Bano y col, 2005; Vanlangenakker y col, 2012), aunque los mecanismos implicados en estas rutas son menos conocidos que en el caso del parthanatos y la necroptosis, si bien moléculas implicadas en estos dos procesos, como PARP-1 o RIP-1 y -3, también participan en buena parte de ellos.

2.2.1. TFD y necrosis

En TFD, necrosis y apoptosis están íntimamente relacionadas, produciéndose un mecanismo u otro en función de la dosis de tratamiento, la disponibilidad de O_2 , la localización subcelular del FS y el tipo celular (Piette y col, 2003; Castano y col, 2006). FSs como la ZnPc (Fabris y col, 2001), el DH-II-24 (Yoo y col,

2011) o Pc4 (Rodríguez y col, 2009) son capaces de inducir tanto apoptosis como necrosis dependiendo de dichos parámetros.

Por otro lado, recientes estudios apuntan a que la TFD con 5-ALA es capaz de inducir necroptosis en células de glioblastoma y de osteosarcoma. En este caso el estímulo inductor es el oxígeno singlete, que se origina en la mitocondria e induce la formación del complejo RIP1-3, que desencadena el proceso, aunque el mecanismo a través del que se interrelaciona la producción de ROS con la activación de RIP1-3 no se conoce (Couppienne y col, 2011a; b).

2.3. Autofagia

Es un proceso celular caracterizado por la vacuolización masiva del citoplasma (Kroemer y Levine, 2008). Descrito por primera vez durante los años 60, se trata de una ruta exclusiva de los organismos eucariotas (Kundu y Thompson, 2008). Durante la autofagia se produce el secuestro de material citoplasmático, en el interior de vesículas llamadas autofagosomas. Estas vesículas, formadas por una doble membrana, contienen porciones de citosol y orgánulos intactos, tales como mitocondrias o el retículo endoplasmático. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas dando lugar a autolisosomas, que constan de una membrana sencilla y contienen en su interior orgánulos en distintos grados de degradación (Kroemer y Levine, 2008).

La autofagia fue inicialmente descrita como un mecanismo de supervivencia en respuesta al estrés causado por la escasez de nutrientes, de modo que el ADN dañado, las proteínas disfuncionales y los orgánulos alterados, pueden disociarse en nucleótidos, aminoácidos y ácidos grasos, que se reciclan para sintetizar las macromoléculas y el ATP necesarios para continuar con las funciones celulares básicas (Denton y col, 2012). Sin embargo, sus funciones abarcan otros aspectos como la supervivencia celular, el metabolismo celular, el desarrollo, el envejecimiento y la inmunidad (Mizushima y col, 2008; Yang y Klionsky, 2010). En cuanto a su papel como mecanismo de muerte celular, aún no está claro su rol exacto.

La autofagia se puede dividir en las siguientes fases (Fig. 6) (Denton y col, 2012):

- **Inducción:** en primer lugar se produce la activación del Complejo de Genes relacionados con la Autofagia-1 (Atg1).
- **Nucleación:** en esta fase comienza la formación de la vesícula autofágica, que envuelve al material citoplasmático que será degradado.
- **Elongación y finalización:** a continuación, el tamaño de la vesícula se incrementa y termina de englobar el material citoplasmático. Está mediada por dos sistemas de ubiquitinización, Atg7 y Atg3.
- **Fusión, degradación y reciclado:** el autofagosoma se fusiona con los lisosomas, formando un autolisosoma, cuyo contenido es degradado.

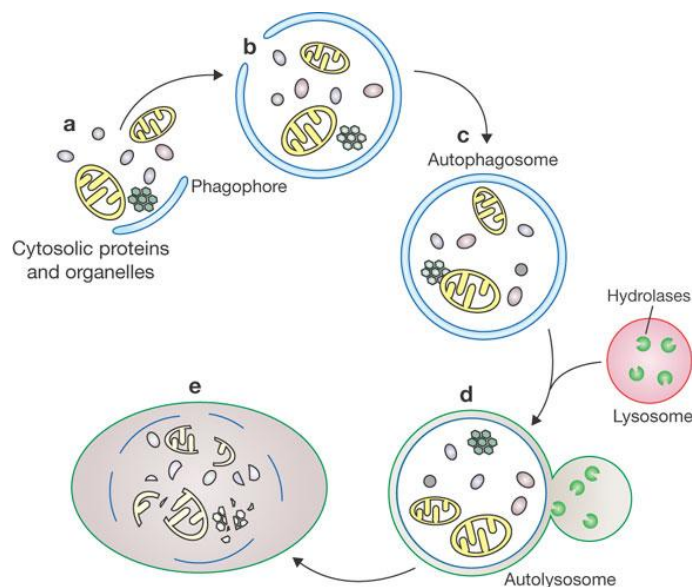


Figura 6. Fases de la autofagia (Xie y Klionsky, 2007. Nat Cell Biol 9:1102 - 1109)

2.3.1. Autofagia como mecanismo de muerte celular

Al ser un mecanismo que se activa en respuesta a situaciones de estrés celular, es habitual que durante los procesos de muerte, las células presenten algunas características propias de la autofagia. Por ejemplo, los cultivos celulares privados de los nutrientes necesarios en el medio, sufren un proceso apoptótico, aunque simultáneamente activan la ruta autofágica con el fin de tratar de evitar la muerte celular, lo que puede llevar a error a la hora de determinar qué tipo de mecanismo de muerte está actuando. Por este motivo es importante establecer una serie de criterios a la hora de clasificar un tipo de

muerte como autofagia. En 2011, Shen y Codogno propusieron los siguientes tres criterios para definir este tipo de muerte celular:

- Ocurre de una forma independiente a la apoptosis, es decir, sin que la maquinaria apoptótica sea imprescindible para que se produzca la inactivación celular.
- Se produce un incremento del flujo autofágico y no solo de los marcadores propios de este proceso, como por ejemplo, el número de autofagosomas. El flujo autofágico se define como la cantidad de material degradable transportado desde los autofagosomas a los lisosomas (Shen y Codogno, 2011).
- El uso de inhibidores génicos o químicos de la autofagia es capaz de prevenir la muerte celular.

Un reciente estudio realizado con inhibidores de la autofagia, ha puesto de manifiesto que este mecanismo de inactivación celular es algo poco común *in vitro* (Shen y col, 2011). Sin embargo, el estudio de diversos organismos modelo, ha mostrado la importancia de este proceso como mecanismo de muerte celular, fundamentalmente durante el desarrollo de ciertas especies como *Arabidopsis thaliana* (Kwon y col, 2010a y b) o *Drosophila melanogaster* (Berry y Baehrecke, 2007; Denton y col, 2012).

Por otra parte, también se han observado procesos de muerte celular por autofagia en determinados tipos celulares, en respuesta a ciertos compuestos quimioterapéuticos, especialmente en los casos en que las células presentan carencia de alguno de los componentes de la vía apoptótica, como las caspasas o Bax (Yu y col, 2004; Fazi y col, 2008; Laane y col, 2009), aunque es algo poco habitual.

En células tumorales, la autofagia tiene un papel doble. Por un lado tiene una función de supervivencia, puesto que permite que las células tumorales puedan superar las condiciones de escasez de nutrientes habituales en los tumores. También les protege de la quimio y la radioterapia, gracias al reciclaje de orgánulos que este proceso conlleva y que aporta a la célula los nutrientes necesarios para superar estos factores de estrés, evitando la apoptosis (Levine, 2007; Mathew y col, 2007). Sin embargo, la autofagia

también puede actuar favoreciendo la muerte celular en tumores (Gozuacik y Kimchi; 2004). Se ha observado que en determinados casos, la inhibición o inactivación de genes asociados con la autofagia favorece la tumorigénesis, mientras que la sobreexpresión de éstos tiene el efecto contrario (Amaravadi y Thompson, 2007; Levine, 2007).

Por último, pese a las diferencias morfológicas y fisiológicas entre autofagia y apoptosis, cada vez resulta más patente que ambos procesos están interrelacionados, actuando de forma sinérgica en algunos casos, mientras en otros, la autofagia solo actúa cuando la apoptosis está suprimida (Thorburn, 2008; Cheng y col, 2009; Liu y col, 2009).

2.3.2. TFD y autofagia

Dado que la autofagia se desencadena en respuesta a estímulos dañinos como el estrés oxidativo, no es de extrañar que la TFD sea capaz de inducir este proceso (Agostinis y col, 2011). Se ha observado que en células carentes de Bax y Bak, el tratamiento fotodinámico con HYP (Buytaert y col, 2006a; b) o con Pc 4 (Xue y col, 2007), es capaz de inducir un proceso autofágico, lo que sugiere que este proceso tiene lugar en células cuya maquinaria apoptótica está alterada. Sin embargo, es bastante común que la TFD induzca procesos autofágicos y apoptóticos de forma simultánea (Reiners y col, 2010). Es el caso de las células tratadas con los fotosensibilizantes CPO (Kessel y col, 2006) y *m*-THPC (Sasnauskiene y col, 2009b), que presentan características de ambos procesos.

Por otro lado, también está descrito que la autofagia puede actuar protegiendo a las células frente al estrés fototóxico inducido por la TFD, especialmente frente a dosis bajas de tratamiento (Kessel y col, 2006; Andrzejak y col, 2011a). En las células de hepatoma de ratón, Hepa-1c1c7, la autofagia tiene una función prosupervivencia frente al daño producido en las mitocondrias por tratamientos fotodinámicos con dosis bajas de verteporfirina (Andrzejak y col, 2011a)

2.4. Otros tipos de muerte celular

Además de los tres mecanismos de muerte mencionados, existen una serie de rutas de muerte celular cuya clasificación no está muy clara (Galluzi y col, 2012).

Entre estos mecanismos destaca la catástrofe mitótica, que hace referencia a un tipo de muerte celular caracterizado por la presencia de mitosis aberrantes, y que se desencadena durante la propia mitosis (Castedo y col, 2004; Rello-Varona y col, 2008; Vakifahmetoglu y col, 2008). Sin embargo, no se trata de un mecanismo de muerte celular propiamente dicho, sino que precede a otros mecanismos, ya sean de muerte celular o de senescencia. Se caracteriza por iniciarse en respuesta a alteraciones en algún elemento del aparato de replicación celular, como los cromosomas o alguno de los elementos de la maquinaria que controlan la correcta segregación de las cromátidas hermanas. Se inicia durante la mitosis y viene acompañada en mayor o menor medida por una parada del ciclo celular en metafase. Finaliza con la muerte de la célula, generalmente por apoptosis, o la entrada de ésta en senescencia.

Otros mecanismos de muerte celular, como el anoikis (Reginato y col, 2003; Maillieux y col, 2007) o la netosis (Remijnsen y col, 2011a; b), son variantes de la apoptosis intrínseca y la autofagia respectivamente, y tienen lugar en ciertos tipos celulares específicos (células adherentes y granulocíticas respectivamente).

Finalmente, otras rutas como la entosis (Overholtzer y col, 2007) o la piroptosis (Brennan y Cookson, 2000; Fink y col, 2008), presentan características atípicas que impiden encuadrarlas dentro de los tres mecanismos clásicos de muerte celular, por lo que existen dudas de si son variantes de dichas rutas, o bien se trata de mecanismos de muerte celular propiamente dichos.

An abstract graphic featuring three blue circles of varying sizes. The top circle is the largest, the middle one is the smallest, and the bottom one is the largest. They are arranged along a diagonal line that runs from the top left towards the bottom right. The circles have a layered, 3D effect with different shades of blue. Thin blue lines extend from the top left corner towards the circles.

Capítulo 1A.

**Influencia de la dosis de
tratamiento y de la línea
celular en la inactivación
producida por los
tratamientos con ZnPc y luz.**

1A.1. Resumen

En este apartado, se relacionan los resultados obtenidos en los estudios del mecanismo de inactivación celular inducido por los tratamientos fotodinámicos con ZnPc, incluida en liposomas de difosfatidil-colina (DPPC) en células HeLa, en función de la dosis de tratamiento. La ZnPc es un FS de segunda generación ampliamente estudiado y un firme candidato para su aplicación clínica en el futuro. Además hemos valorado la influencia de la línea celular, comparando la respuesta de las células HeLa con los resultados obtenidos en células A-549, completando pruebas experimentales previas.

Para determinar el tipo de mecanismo de muerte implicado se realizaron diversos ensayos: H-33258, TUNEL y ANV/IP. Además, se estudió cual es el orgánulo subcelular encargado de disparar el proceso de muerte celular, para lo que se analizó la localización subcelular y se realizaron tinciones de inmunofluorescencia para golgina-130, caspasa-2 y citocromo C. Los resultados obtenidos en ambas líneas celulares eran muy similares, e indican que los fototratamientos con ZnPc durante 1 h, inducen un proceso de tipo necrótico, mientras que las incubaciones de 3 h con el FS dan lugar a una inactivación celular generalizada por un proceso que presenta características tanto necróticas como apoptóticas, que podría corresponder con un mecanismo de necrosis regulada.

Nuestros resultados apuntan a que modificando el tiempo de incubación, es posible modular el mecanismo de muerte inducido por los tratamientos fotodinámicos.

1A.2. Objetivos

- Caracterizar el mecanismo de muerte celular inducido por la ZnPc en células HeLa, en función del tiempo de incubación.
- Completar los estudios realizados por nuestro grupo de investigación sobre la fotoinactivación mediada por ZnPc en células A-549.
- Determinar si existen diferencias en la ruta de muerte en función del tipo celular, comparando los resultados obtenidos en células HeLa con los de células A-549.

1A.3. Resultados

1A.3.1. Supervivencia celular

La supervivencia de las células HeLa, 24 h después de los tratamientos de 1 o 3 h con ZnPc, se puede observar en la Tabla 1.

En ausencia de irradiación, observamos que las incubaciones con el FS durante 1 o 3 h no alteran la viabilidad celular, presentando unos valores similares a los de los controles. Por el contrario, después de 10 min de irradiación, las células incubadas con ZnPc durante 1 o 3 h, mostraban un descenso de la supervivencia cercano al 100% en ambos casos.

Estas variaciones en la supervivencia son muy similares a las descritas en células A-549, sometidas a los mismos tratamientos (Cristobal y col, 2006).

Tabla 1. Supervivencia de las células HeLa sometidas a los distintos tratamientos, tanto en presencia como en ausencia de irradiación.

Tratamientos	SIN IRRADIACIÓN		10 MIN IRRADIACIÓN	
	Supervivencia celular (%)	DE	Supervivencia celular (%)	DE
Control	100	3,42	100	3,72
ZnPc 1h	99,49	4,65	8,07	4,64
ZnPc 3h	98,61	2,91	4,28	4,37

Los datos obtenidos representan la media y la desviación estándar (DE) de al menos seis experimentos distintos.

1A.3.2. Morfología nuclear

Se estudió la evolución morfológica de los núcleos de las células HeLa tratadas con ZnPc durante 1 y 3 h, para lo que procesaron las células con H-33258 a distintos tiempos después de los tratamientos. Los resultados se pueden observar en la figura 1.

Las células tratadas con ZnPc en ausencia de irradiación, no muestran alteraciones morfológicas significativas con ninguna de las condiciones experimentales estudiadas, presentando a todos los tiempos, un aspecto equivalente al de los controles (Fig. 1A).

Por el contrario, las células incubadas con el FS durante 1 h, irradiadas 10 min y procesadas 1 h después del tratamiento presentan en su mayoría un núcleo pequeño, redondo y con una cromatina muy condensada, lo que se corresponde con una muerte por necrosis (Fig. 1B), si bien es posible encontrar algunos núcleos con la cromatina más laxa. Esta morfología necrótica se mantiene casi idéntica hasta 24 h después de la irradiación (Fig. 1C). Las células tratadas 3 h con ZnPc, irradiadas y teñidas 1 h después, comienzan a mostrar signos de condensación intranuclear de la cromatina, que forma pequeños gránulos (Fig. 1D). 3 h después de los tratamientos, dicha condensación es patente (Fig. 1E).

Finalmente, 24 h después de los tratamientos, las células presentan unos núcleos de mayor tamaño que los de las células control, con la cromatina formando gránulos muy condensados, en número y tamaño variable, y distribuidos dentro del núcleo de forma irregular, manteniéndose la envoltura nuclear aparentemente intacta (Fig. 1F).

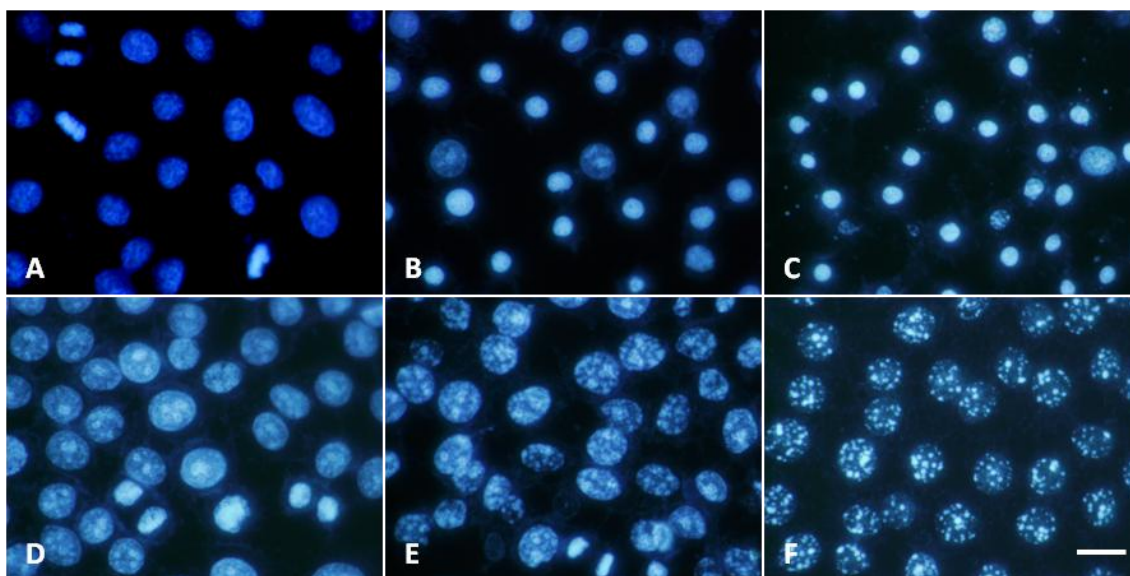


Figura 1. Células HeLa, fijadas a distintos tiempos después de los tratamientos fotodinámicos y teñidas con H-33258. **A:** células control. **B:** células tratadas con ZnPc 1 μ M durante 1 h, irradiadas 10 min y procesadas 1 h después. **C:** células tratadas con ZnPc 1 μ M durante 1 h, irradiadas 10 min y procesadas 24 h después. **D:** células incubadas con ZnPc 1 μ M durante 3 h, irradiadas 10 min y procesadas 1 h después. **E:** células tratadas con ZnPc 1 μ M durante 3 h, irradiadas 10 min y procesadas 3 h después. **F:** células incubadas con ZnPc 1 μ M durante 3 h, irradiadas 10 min y procesadas 24 h después. Barra de escala: 20 μ m.

Esta morfología no se corresponde con un proceso apoptótico, ni con un proceso necrótico clásico. En lo sucesivo, nos referiremos a los núcleos que presentan esta morfología como núcleos granulados. Estas alteraciones morfológicas son análogas a las descritas en células A-549, sometidas a los mismos tratamientos (Cristobal y col, 2006).

1A.3.3. Ensayo TUNEL

Se utilizó el ensayo TUNEL para detectar la presencia de extremos 3'-OH libres en el ADN, característica típica de los procesos apoptóticos. Los resultados se muestran en la figura 2. En los controles observamos la ausencia de marcaje nuclear (Fig. 2A). Las células incubadas con ZnPc 1 h, irradiadas y procesadas 3 h después (Fig. 2B), tampoco presentan marcaje positivo, observándose únicamente un ligero fondo verde.

Por otro lado, las células incubadas 3 h y procesadas 3 h después de irradiar (Fig. 2C), presentan un intenso marcaje nuclear, apreciándose los gránulos de cromatina. En células A-549 obtuvimos unos resultados muy similares, observándose un marcaje positivo solo en células incubadas con ZnPc durante 3 h (Fig. 2D).

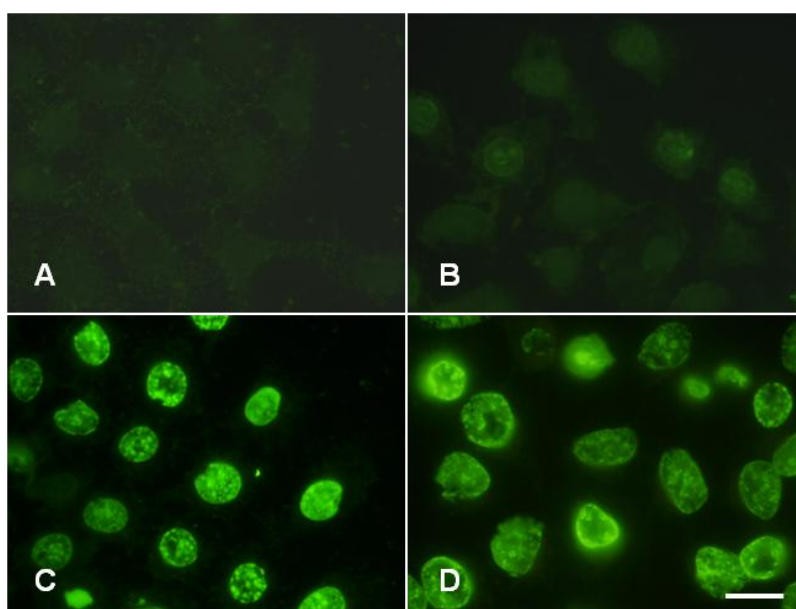


Figura 2. Células procesadas para el ensayo TUNEL, 3 h después de los tratamientos fotodinámicos. **A:** células HeLa control. **B:** células HeLa incubadas 1 h con ZnPc 1 μ M e irradiadas 10 min. **C:** células HeLa incubadas 3 h con ZnPc 1 μ M e irradiadas 10 min. **D:** células A-549 incubadas 3 h con ZnPc 1 μ M 3 irradiadas 10 min. Barra de escala: 20 μ m.

1A.3.4. Ensayo Annexina V/ Ioduro de propidio (ANV/IP)

En la figura 3 podemos observar los resultados del ensayo ANV/IP. Los controles no mostraron marcaje positivo para la ANV, ni para el IP (Fig. 3A). Las células incubadas con ZnPc durante 1 h (Fig. 3C) o durante 3 h (Fig. 3E) y procesadas inmediatamente después de irradiar, no presentaban marcaje positivo para ANV, lo que indica que no se ha producido translocación de la PS, pero la mayoría de los núcleos mostraban la fluorescencia roja del IP, debido a la rápida pérdida de la integridad de la membrana plasmática. En células A-549 obtuvimos un resultado equiparable, observándose con tratamientos tanto de 1 h como de 3 h, una rápida pérdida de la integridad de la membrana plasmática (datos no mostrados).

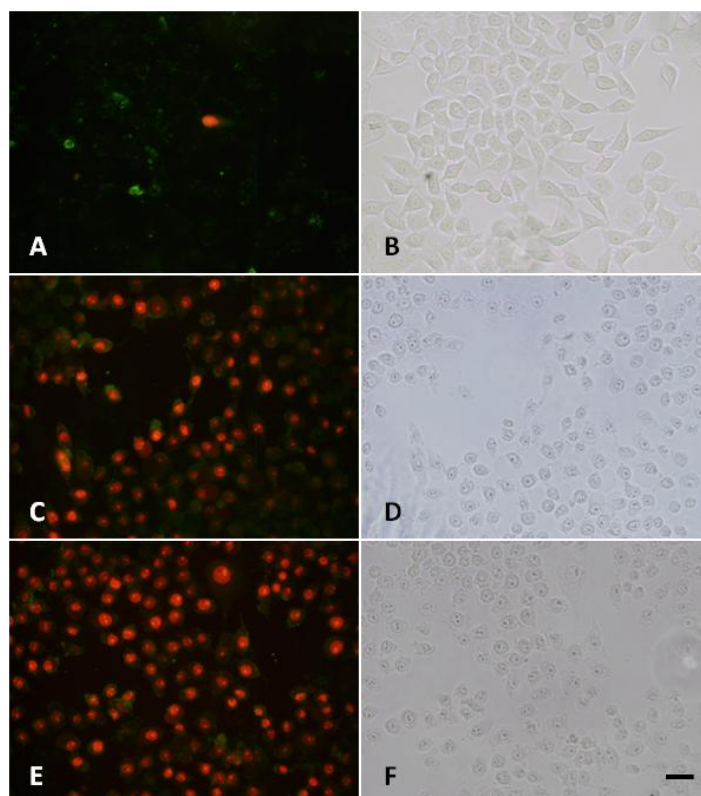


Figura 3. Células HeLa procesadas para el ensayo ANV/IP, inmediatamente después de los tratamientos fotodinámicos. **A:** células control. **B:** las mismas células observadas en contraste de fase. **C:** células incubadas 1 h con ZnPc 1 μ M e irradiadas. **D:** las mismas células observadas en contraste de fase. **E:** células incubadas 3 h con ZnPc 1 μ M e irradiadas. **F:** las mismas células observadas en contraste de fase. Barra de escala: 20 μ m.

1A.3.5. Localización subcelular

Se estudió la localización subcelular de la ZnPc después de 1 o 3 h de incubación. En las células incubadas durante 1 h con el FS, no era posible localizar la ZnPc en el interior celular, presentando las células un aspecto equivalente al de los controles (Fig. 4A), en los que se observaba únicamente la autofluorescencia azul de las mitocondrias en el citoplasma celular. Por el contrario, las células incubadas con ZnPc durante 3 h presentaban la fluorescencia roja del FS en posición perinuclear (Fig. 4B).

Esta localización se ha asociado con el aparato de Golgi por diversos autores (Fabris y col, 2001; Rello-Varona y col, 2008), y coincide con la descrita en células A-549 sometidas a las mismas incubaciones (Cristobal y col, 2006).

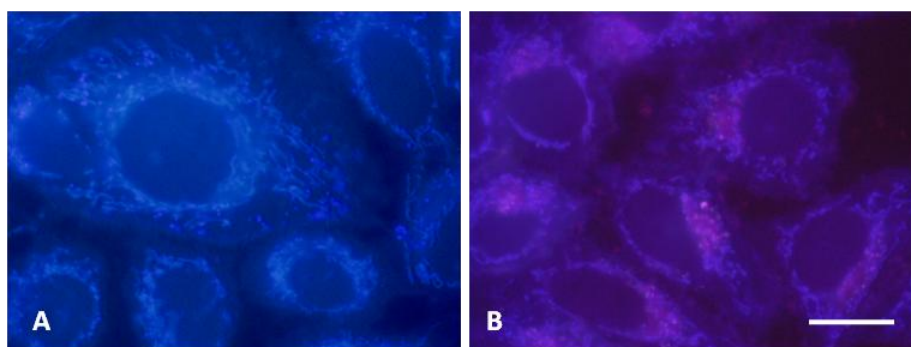


Figura 4. Células HeLa observadas en microscopia de fluorescencia, bajo excitación con luz UV, sin ningún procesamiento. **A:** células control. **B:** células incubadas con ZnPc 1 μ M durante 3 h. Barra de escala: 20 μ m.

1A.3.6. Aparato de Golgi

Se evaluó el efecto que tienen los tratamientos fotodinámicos sobre el aparato de Golgi, mediante inmunofluorescencia indirecta para golgina-130. Los resultados se observan en la figura 5.

Las células incubadas con ZnPc durante 1 h, irradiadas 10 min y procesadas inmediatamente después (Fig. 5B), presentan la señal de la golgina localizada en posición perinuclear, de forma análoga a los controles (Fig. 5A). 3 h después del tratamiento (Fig. 5C), la estructura del aparato de Golgi aún se conserva bien organizada. Por otro lado, las células incubadas 3 h y procesadas inmediatamente después de irradiar (Fig. 5D), presentan una rápida desorganización del orgánulo, observándose un marcaje mayoritariamente

difuso. En células A-549, sometidas a las mismas condiciones experimentales, observamos una respuesta similar, que coincide con la descrita anteriormente por Cristobal y col (2006).

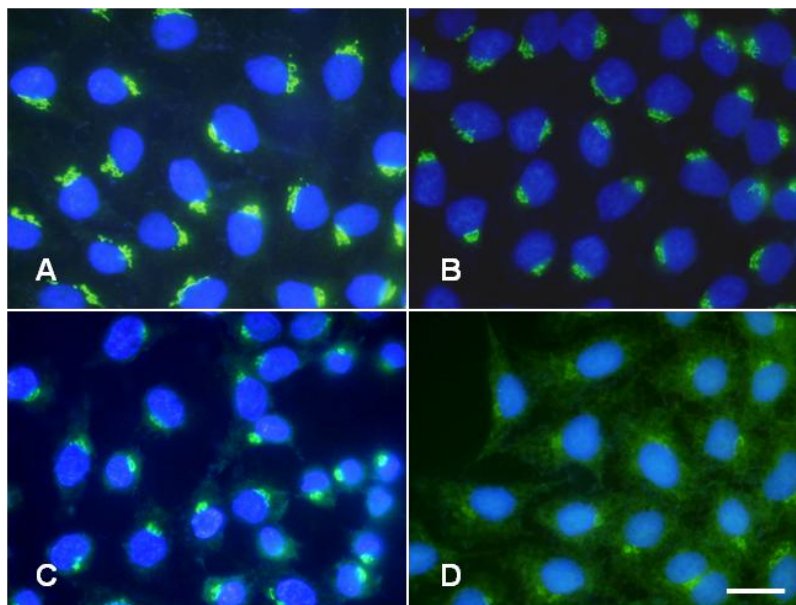


Figura 5. Células HeLa fijadas a distintos tiempos postincubación, teñidas por inmunofluorescencia indirecta para GM130 y contrateñidas con H-33258. **A:** células control. **B:** células incubadas 1 h con ZnPc 1 μ M, irradiadas 10 min y procesadas inmediatamente después. **C:** células procesadas 3 h después de los tratamientos de 1 h con ZnPc 1 μ M. **D:** células incubadas 3 h con ZnPc 1 μ M, irradiadas 10 min y procesadas inmediatamente después. Barra de escala: 20 μ m.

1A.3.7. Caspasa-2 activa

En la figura 6 podemos observar las células procesadas para inmunofluorescencia indirecta de caspasa-2 activa, a distintos tiempos después de irradiar. En células HeLa, 1 h después de los tratamientos fotodinámicos, no se aprecia activación de la caspasa-2, ni con incubaciones de 1 h (Fig. 6B) ni de 3 h (Fig. 6C), observándose solo un ligero fondo rojo, de forma análoga a lo visto en los controles (Fig. 6A). Este resultado difiere sensiblemente del obtenido en células A-549, donde la incubación durante 3 h con la misma concentración de FS, induce la inmediata activación de la caspasa-2. En este caso, el marcaje se sitúa perinuclearmente y se mantiene hasta 1 h después de irradiar (Fig. 6D), momento en que se puede empezar a observar la condensación de la cromatina en forma de gránulos.

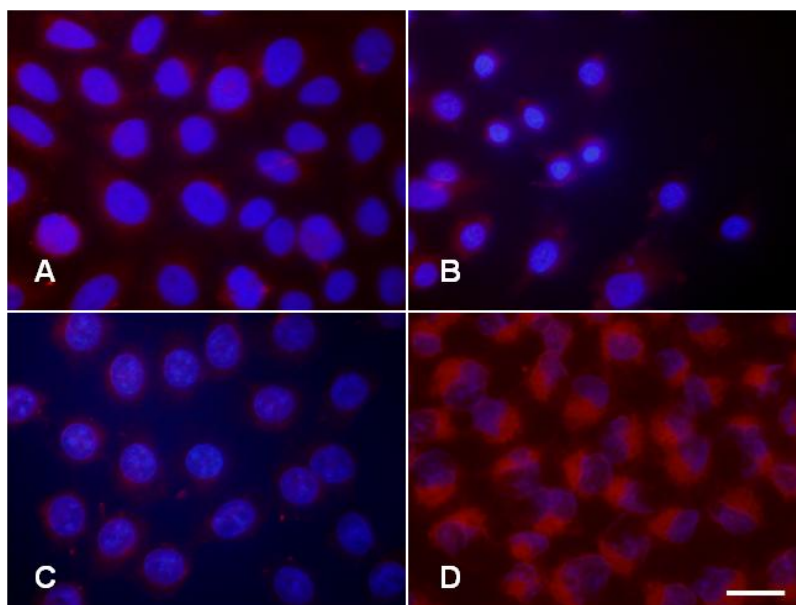


Figura 6. Células procesadas para inmunofluorescencia indirecta para caspasa-2 activa y contrateñidas con H-33258. **A:** células HeLa control. **B:** células HeLa incubadas 1 h con ZnPc 1 μ M, irradiadas 10 min y procesadas 1 h después. **C:** células HeLa, procesadas 1 h después de los tratamientos de 3 h con ZnPc 1 μ M. **D:** células A-549 incubadas 3 h con ZnPc 1 μ M, irradiadas 10 min y procesadas 1 h después. Barra de escala: 20 μ m.

1A.3.8. Citocromo C

Se estudió la translocación del citocromo C (cit C) desde las mitocondrias al citoplasma, mediante inmunofluorescencia indirecta. Los resultados en células HeLa se observan en la figura 7. En las células control, el cit C se encuentra localizado en el interior de las mitocondrias, siendo posible observar claramente la morfología de estos orgánulos (Fig. 7A). Las células tratadas con ZnPc durante 1 h y procesadas inmediatamente después de irradiar (Fig. 7B), aún conservan el cit C bastante localizado en el interior mitocondrial, especialmente en la región perinuclear. Esta situación se mantiene hasta 2 h después de irradiar (Fig. 7C), donde aún se conserva parte del cit C localizado en las mitocondrias, aunque estas presentan un aspecto granular. Por el contrario, las células incubadas 3 h con el FS presentan la translocación del cit C inmediatamente después de irradiar (Fig. 7D). En este caso, únicamente se observa un marcaje citoplasmático difuso, no siendo posible apreciar la morfología mitocondrial. Las células A-549 sometidas a las mismas condiciones

experimentales, presentaban un comportamiento análogo (datos no mostrados).

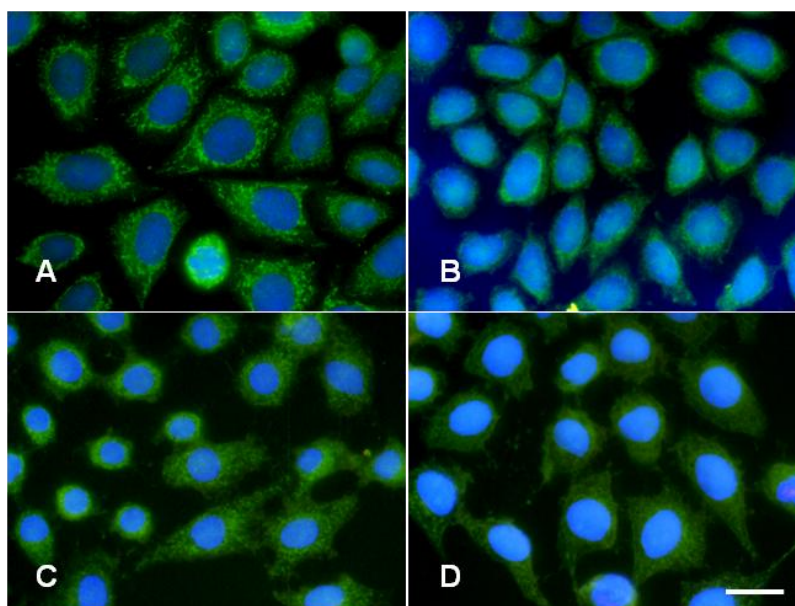


Figura 7. Células HeLa procesadas para inmunofluorescencia indirecta para citocromo C y contrateñidas con H-33258. **A:** células control. **B:** células incubadas 1 h con ZnPc 1 μ M, irradiadas 10 min y procesadas inmediatamente después. **C:** células procesadas 2 h después de los tratamientos de 1 h con ZnPc 1 μ M. **D:** células incubadas 3 h con ZnPc 1 μ M, irradiadas 10 min y procesadas inmediatamente después. Barra de escala: 20 μ m.

1A.3.9. Tratamientos en presencia de Necrostatina-1

Se evaluó el efecto que la Necrostatina-1 (Nec-1), un inhibidor de la necroptosis, tiene sobre los tratamientos fotodinámicos con ZnPc en células HeLa.

1A.3.9.1. Supervivencia celular

En la figura 8 se muestra el efecto de la Nec-1 (300 μ M), tanto sola como en presencia de ZnPc, sobre la supervivencia de las células HeLa.

En ausencia de irradiación (Fig. 8A y C), los tratamientos con Nec-1 y/o el FS, no alteraban significativamente la viabilidad celular, que se mantenía por encima del 90% con ambos tiempos de incubación.

Después de 10 min de irradiación (Fig. 8B y D), los tratamientos solo con Nec-1 tampoco afectaban a la supervivencia de los cultivos. En cuanto a los tratamientos con ZnPc+Nec-1, el inhibidor no alteraba el efecto fotodinámico del FS, observándose una inactivación celular cercana al 100% con los tratamientos con ZnPc durante 1 o 3 h, tanto en presencia como en ausencia de Nec-1.

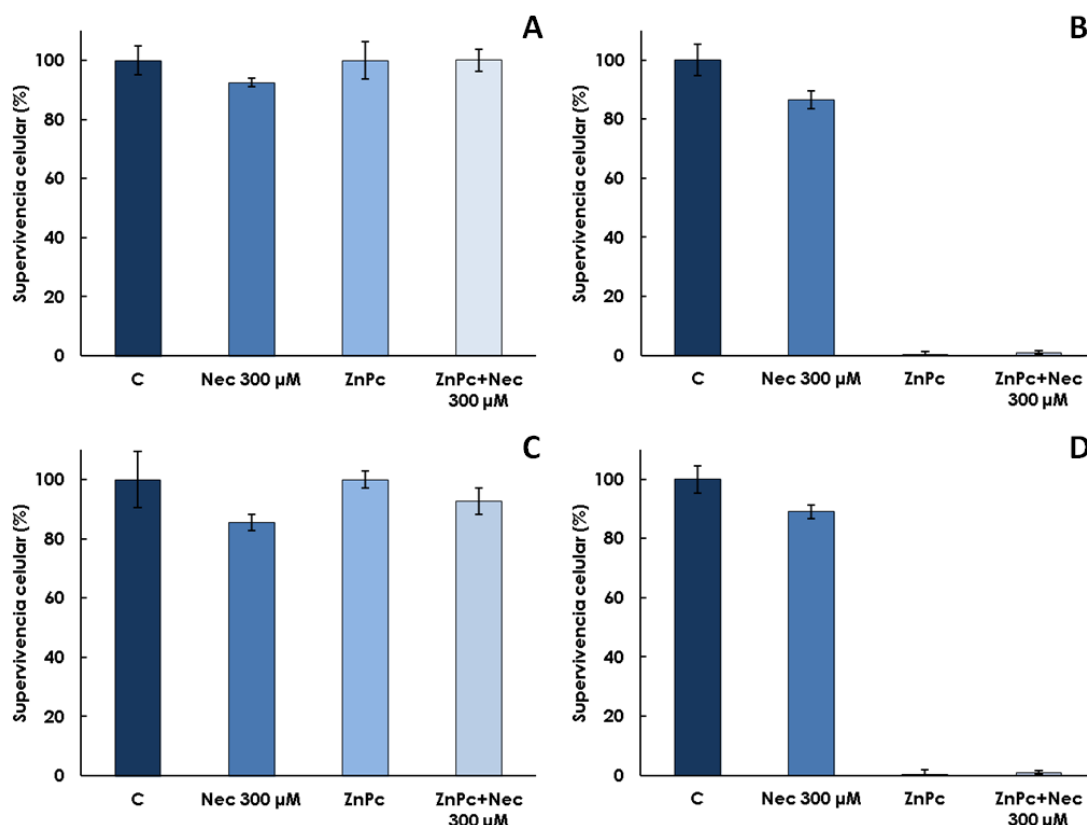


Figura 8. Supervivencia de las células HeLa, incubadas con ZnPc y/o Necrostatina-1 (300 μM). **A:** células tratadas 1 h en ausencia de irradiación. **B:** células incubadas 1 h e irradiadas 10 min. **C:** células tratadas 3 h en ausencia de irradiación. **D:** células incubadas 3 h e irradiadas 10 min.

1A.3.9.2. Morfología nuclear

La observación morfológica de las células, fijadas 24 h después de los tratamientos de 1 h con ZnPc en presencia de Nec-1 y procesadas con H-33258, se muestra en la figura 9. En ausencia de irradiación, todos los tratamientos presentaban un aspecto análogo al de los controles (Fig. 9A), sin cambios morfológicos significativos.

Después de 10 min de irradiación, las células incubadas con Nec-1 (Fig. 9B) tampoco presentaban alteraciones, lo que indica que bajo estas condiciones experimentales, este compuesto no presenta un comportamiento fotodinámico. Las células incubadas 1 h con ZnPc sola (Fig. 9C) o en presencia de Nec-1 (Fig. 9D), mostraban un aspecto similar, independientemente de la concentración de inhibidor utilizada, sufriendo una inactivación generalizada por un proceso necrótico.

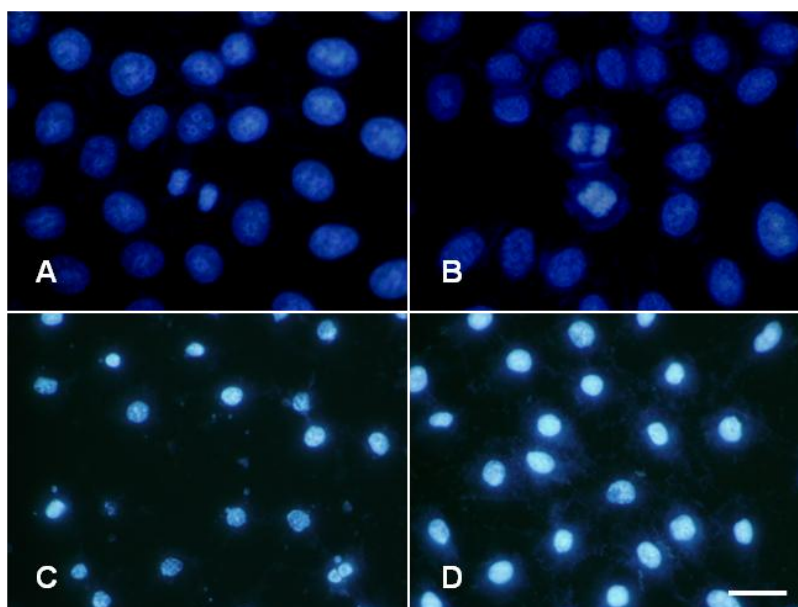


Figura 9. Células HeLa fijadas 24 h después de los tratamientos y procesadas con H-33258. **A:** células control. **B:** células tratadas con Nec-1 300 μ M durante 1 h e irradiadas 10 min. **C:** células tratadas con ZnPc 1 μ M durante 1 h e irradiadas 10 min. **D:** células incubadas con ZnPc 1 μ M en presencia de Nec-1 300 μ M, durante 1 h e irradiadas 10 min. Barra de escala: 20 μ m.

Por otro lado, las células tratadas 3 h en ausencia de irradiación, tampoco presentaban cambios morfológicos, mostrando unos núcleos análogos a los de los controles. Sin embargo, después de 10 min de irradiación, mientras que las células tratadas solo con Nec-1 no presentaban alteraciones con ninguna de las concentraciones de inhibidor estudiadas, aquellas células incubadas con ZnPc en presencia de distintas concentraciones de Nec-1, sufrían un cambio en el mecanismo de muerte producido por los tratamientos fotodinámicos.

Esta variación era dependiente de concentración, tal como vemos en la figura 10. Los tratamientos fotodinámicos en presencia de concentraciones de Nec-1 inferiores a 150 μM (Fig. 10B), no presentan cambios significativos en el tipo de muerte celular observado, que es el mismo que en células tratadas solo con el FS (Fig. 10A). Sin embargo, en células tratadas con ZnPc+Nec-1 150 μM (Fig. 10C), se empieza a observar la aparición de núcleos necróticos. Este efecto es más claro en células incubadas con ZnPc+Nec-1 200 μM (Fig. 10D), donde la cantidad de núcleos necróticos y granulados es equivalente. Finalmente, en los tratamientos con ZnPc en presencia de Nec-1 a una concentración 300 (Fig. 10E) o 400 μM (Fig. 10F), los núcleos son mayoritariamente necróticos, aunque era posible encontrar algunos núcleos con la cromatina condensada formando gránulos. Este resultado supone un cambio importante en la morfología nuclear, con respecto a la obtenida con los tratamientos realizados solo con el FS.

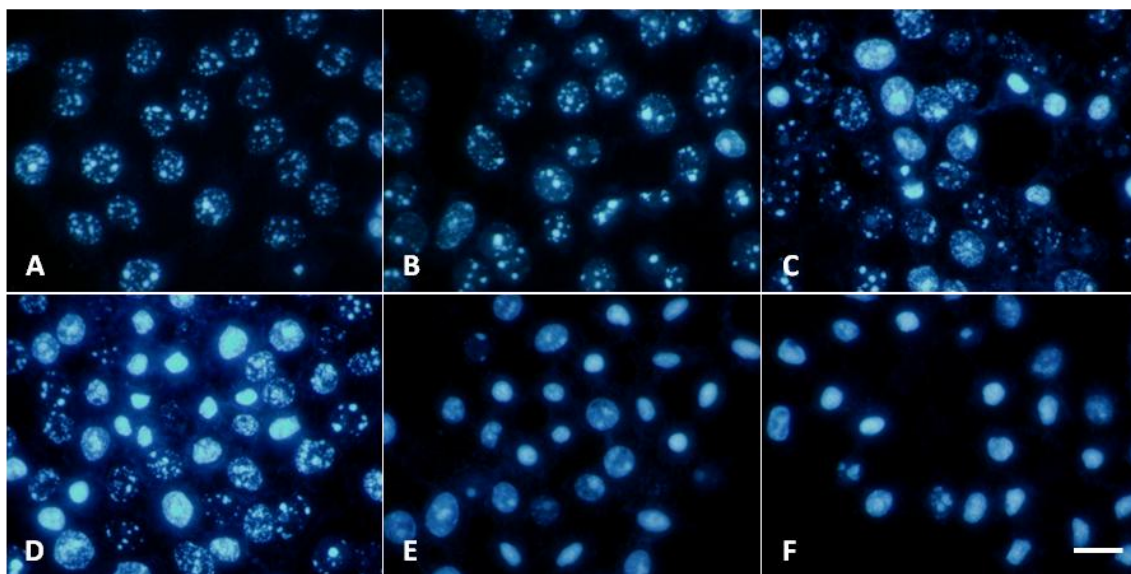


Figura 10. Células HeLa fijadas 24 h después de los tratamientos fotodinámicos con ZnPc, en presencia de distintas concentraciones de Nec-1, y procesadas con H-33258. **A:** células incubadas 3 h solo con ZnPc. **B:** células tratadas 3 h con ZnPc+Nec-1 100 μM . **C:** células tratadas 3 h con ZnPc+Nec-1 150 μM . **D:** células tratadas 3 h con ZnPc+Nec-1 200 μM . **E:** células tratadas 3 h con ZnPc+Nec-1 300 μM . **F:** células tratadas 3 h con ZnPc+Nec-1 400 μM . Barra de escala: 20 μm .

Para confirmar estos resultados, se hicieron recuentos de las células tratadas 3 h con ZnPc en presencia de las distintas concentraciones de Nec-1, para determinar el porcentaje de núcleos granulados y necróticos. Los resultados de estos recuentos se pueden observar en la figura 11, representados como una curva. Con concentraciones de Nec-1 inferiores a 150 μM , el número de células con la cromatina condensada formando gránulos es superior al 80%, pero a partir de esta concentración, su número decae, siendo sustituidas por células necróticas. En los tratamientos fotodinámicos con concentraciones de Nec-1 superiores a 300 μM , el porcentaje de núcleos necróticos es superior al 80%. Estos resultados apuntan a que la Nec-1 presenta un comportamiento dependiente de concentración, siendo capaz de modificar significativamente el tipo muerte celular inducido por la ZnPc, cuando se administra a concentraciones superiores a 150 μM .

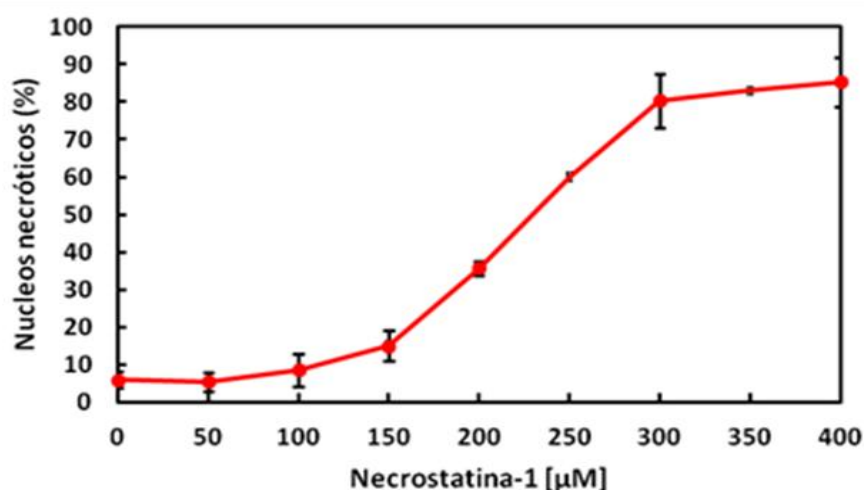


Figura 11. Porcentaje de núcleos necróticos, en células HeLa incubadas con ZnPc 1 μM en presencia de distintas concentraciones de Nec-1, irradiadas 10 min y observadas 24 h después. Cada valor corresponde a la media de al menos tres experimentos independientes. En cada muestra experimental se contó un mínimo de 2000 células.

1A.4. Discusión

Como ya se ha comentado en la introducción, en cultivos celulares es posible inducir distintos tipos de muerte celular variando las condiciones de los tratamientos fotodinámicos. Parámetros como el tipo celular, la concentración de FS, el tiempo de incubación o la dosis de luz, determinan el mecanismo por el que las células se inactivan ante los tratamientos fotodinámicos.

Dada la heterogeneidad molecular y bioquímica de las células tumorales, conocer el mecanismo preciso de muerte celular producido por las distintas terapias antineoplásicas, es especialmente importante para el desarrollo de tratamientos personalizados frente al cáncer.

En este trabajo hemos estudiado, en células HeLa, el mecanismo de muerte celular inducido por los tratamientos con ZnPc incluida en liposomas de DPPC, en función del tiempo de incubación. Además, con el fin de completar trabajos realizados por nuestro grupo (Cristóbal et al, 2006), se han realizado distintas pruebas en células A-549, para valorar la posibilidad de que existan cambios en el mecanismo de inactivación celular en función de la línea celular. En ambas líneas celulares, se siguió el mismo procedimiento experimental: las células se incubaron en presencia del FS, a una concentración 1 μ M, durante 1 o 3 h. A continuación se irradiaron 10 min y se procesaron a distintos tiempos después de la irradiación.

En células HeLa, los tratamientos fotodinámicos con ZnPc, tanto con 1 h como con 3 h de incubación, producen una inactivación celular cercana al 100%. Sin embargo, a nivel morfológico, el mecanismo de muerte producido en cada caso es diferente. Mientras que con 1 h de incubación, los tratamientos fotodinámicos inducen una respuesta necrótica, incubaciones de 3 h con el FS seguidas de 10 min de irradiación, provocan la inactivación celular por un proceso caracterizado por la presencia de unos núcleos en los que la cromatina aparece muy condensada, formando gránulos de tamaño y número variable. Además, el tamaño de estos núcleos es mayor que el de los controles. Este proceso comienza a observarse 1 h después de irradiar y es claramente apreciable a las 3 h postirradiación, manteniéndose hasta 24 h después. Experimentos realizados en células A-549, utilizando las mismas

condiciones experimentales, mostraron un comportamiento similar en esta línea celular, confirmando los resultados descritos previamente por nuestro grupo (Cristobal y col, 2006).

Para determinar el tipo de mecanismo de muerte inducido por la ZnPc en las dos líneas celulares, se realizaron dos ensayos rutinarios: TUNEL y Annexina V/Ioduro de propidio. El ensayo TUNEL se utiliza para detectar la presencia de extremos 3'-OH libres en el ADN, lo que es un indicador de la fragmentación de la cromatina, una característica típica de los procesos apoptóticos. Por otro lado, el ensayo ANV/IP permite evaluar dos aspectos de los procesos de muerte celular: la integridad de la membrana plasmática, que en las fases iniciales de la apoptosis se conserva; y la translocación de fosfatidilserina (PS) de la monocapa interna de la membrana plasmática a la monocapa externa, evento asociado a etapas tempranas de la apoptosis. Tanto en células HeLa como en células A-549 se obtuvieron los mismos resultados. Las células sometidas a los tratamientos fotodinámicos después de 1 h de incubación con el FS, mostraban una inmediata pérdida de la integridad de la membrana plasmática, sin marcaje positivo para ANV y con unos núcleos teñidos con IP. El ensayo TUNEL realizado a las 3 h postirradiación también era negativo, observándose únicamente un ligero marcaje nuclear. Estos resultados son propios de un proceso de tipo necrótico y apoyan los resultados obtenidos en los estudios morfológicos.

Por el contrario, en ambas líneas celulares incubadas 3 h con ZnPc, 3 h después de irradiar el ensayo TUNEL resultaba positivo, observándose un intenso marcaje nuclear, con el que se puede apreciar la fragmentación de la cromatina en pequeños gránulos, lo que indica que en ambos casos se está produciendo un proceso de tipo apoptótico. Sin embargo, el ensayo ANV/IP arrojaba unos resultados similares a los obtenidos con 1 h de incubación, observándose la pérdida de la integridad de la membrana plasmática inmediatamente después de irradiar, lo que no se corresponde con un proceso apoptótico, sino con uno necrótico.

El cambio en el tipo de muerte celular que se observa en función del tiempo de incubación, parece estar relacionado con la distinta localización del FS

después de 1 h y 3 h de incubación. En el primer caso, no es posible localizar el FS en el interior celular, dado que la cantidad de ZnPc internalizada en estas condiciones no es suficiente como para poder ser detectada en microscopia de fluorescencia. Estudios realizados en fibroblastos murinos, indican que con este tiempo de incubación, la ZnPc se localiza mayoritariamente cerca de la membrana plasmática (Fabris y col, 2001), por lo que al irradiar las células, la membrana es la diana primaria del tratamiento, perdiendo rápidamente su integridad y desencadenándose un proceso de tipo necrótico. Por el contrario, después de 3 h de incubación, el FS se localiza en posición perinuclear. Dicha localización ha sido asociada por diversos autores con el aparato de Golgi (AG) (Cristobal y col, 2006; Rello-Varona y col, 2008), lo que sugiere que bajo estas condiciones experimentales, este orgánulo sería la diana primaria del FS.

La rápida desorganización del AG confirma estos resultados. Las células HeLa incubadas con ZnPc 3 h y procesadas para inmunofluorescencia indirecta de golgina-130, una proteína estructural del AG, muestran que este orgánulo se desorganiza inmediatamente después de irradiar, presentando un marcaje difuso y citoplasmático. Por el contrario, en muestras incubadas 1 h con el FS, la señal correspondiente al AG se mantiene bastante localizada en posición perinuclear hasta 3 h después de irradiar. Los experimentos realizados en células A-549 en las mismas condiciones experimentales, presentaron unos resultados equiparables, que concuerdan con los ya descritos por Cristobal y col (2006).

En dicho trabajo, se relacionaba la desorganización del AG con la activación de la caspasa-2. Este enzima puede actuar como iniciadora o como efectora de la apoptosis (Bouchier-Hayes y Green, 2012) y se localiza en el citoplasma y en el núcleo, donde actúa como iniciadora en respuesta al daño en ADN (Machamer, 2003). Además, en algunos tipos celulares también se localiza en la cara citoplasmática de AG, donde actúa como efectora (Mancini y col, 2000; Hicks y Machamer, 2002), respondiendo a señales de estrés celular y degradando la golgina-160, lo que provoca la desorganización del orgánulo. Para evaluar la intervención de la caspasa-2 en el proceso de muerte celular, las células se procesaron para inmunofluorescencia indirecta de caspasa-2,

utilizando un anticuerpo primario que únicamente reconoce la forma activa de esta proteasa. Se estudió tanto en células HeLa como en células A-549, y se obtuvo una respuesta diferencial. En células A-549, los tratamientos de 1 h con ZnPc no presentaban activación de este enzima a ningún tiempo después de la irradiación, pero con 3 h de incubación se podía apreciar la activación de la caspasa-2 inmediatamente después de irradiar, observándose una intensa señal en posición perinuclear, que se mantiene hasta 3 h después de los tratamientos. Por el contrario, en células HeLa, con ninguno de los dos tiempos de incubación estudiados se observaba activación de caspasa-2. Esta diferencia puede implicar que, aunque en ambas líneas celulares los tratamientos fotodinámicos de 3 h de incubación con ZnPc, inducen los mismos cambios morfológicos, las rutas moleculares que intervienen en cada caso son distintas. Otra posibilidad es que la activación de la caspasa-2 no sea imprescindible para inducir este tipo de muerte celular.

También se evaluó el papel que juegan las mitocondrias en la muerte celular inducida por ZnPc. Como se comentó en la introducción, estos orgánulos juegan un papel fundamental en diversos mecanismos de muerte celular, actuando como disparador del proceso en muchos casos (Kroemer y col, 2007). La permeabilización de la membrana mitocondrial provoca la liberación del citocromo C (cit C), una proteína implicada en la cadena de transporte de electrones. Una vez libre en el citoplasma, el cit C es capaz de interactuar con diferentes proteínas, formando un complejo llamado apoptosoma, que activa a la caspasa-9, desencadenando un proceso de tipo apoptótico (Mace y Riedl, 2010). Sin embargo, cada vez existen más estudios que apuntan a que la liberación de elementos que están contenidos en el interior de las mitocondrias, están relacionadas con otros mecanismos de muerte independientes de caspasas (Johnson, 2000; Kroemer y Martin, 2005; Moubarak y col, 2007; Baritaud y col, 2010).

Las tinciones de inmunofluorescencia indirecta para el citocromo C, mostraron que los tratamientos fotodinámicos de 3 h con ZnPc, producen en células HeLa la liberación de esta proteína inmediatamente después de irradiar, observándose un marcaje difuso citoplasmático, lo que implica que puede estar jugando un papel en las fases iniciales del proceso de muerte. Por el

contrario, en muestras tratadas 1 h con el FS, el cit C permanece localizado en las mitocondrias hasta 2 h después de irradiar, por lo que en este caso se puede descartar la participación de esta proteína en las etapas tempranas del mecanismo de muerte. En células A-549, observamos una respuesta equivalente frente a los mismos tratamientos.

Por tanto, las células Hela y A-549, tratadas con ZnPc 1 h presentan las características morfológicas y bioquímicas de un proceso típicamente necrótico: núcleo pequeño, redondo y condensado, ensayo TUNEL y ANV negativo, rápida pérdida de la integridad de la membrana plasmática, y ausencia de activación de caspasa-2 y de relocalización del citocromo C. Por el contrario, el mecanismo de muerte que presentan las células incubadas 3 h con ZnPc, comparte características propias de la apoptosis, como el ensayo TUNEL positivo o la relocalización del cit C, con otras propias de la necrosis como la pérdida temprana de la integridad de membrana.

En los últimos años, diversos trabajos han puesto de manifiesto que existen mecanismos de muerte que presentan características tradicionalmente asociadas tanto a la necrosis como a apoptosis. Estos estudios contradicen la idea clásica de que la apoptosis y la necrosis son dos mecanismos de muerte independientes y bien diferenciados, ya que ambos procesos comparten algunos eventos, al menos en lo referente a las rutas de transducción de señales y a las fases iniciales del proceso de muerte celular, estando íntimamente relacionados (Formigli y col, 2000; Asare y col, 2009; Baritaud y col, 2010; Galluzzi y col, 2012).

Dada la heterogeneidad de este tipo de rutas, existe bastante confusión en la nomenclatura para referirse a estos mecanismos de muerte, utilizándose diversos nombres para referirse a ellos, como aponecrosis, necrapoptosis, muerte celular independiente de caspasas o necroptosis. En la última lista del comité de nomenclatura de muerte celular, proponen utilizar el término "necrosis regulada" para englobar estos mecanismos, que tienen lugar en respuesta a la exposición a determinadas excitotoxinas, patógenos, el daño por alquilación del ADN, irradiación, estrés oxidativo o la unión de determinados ligandos a receptores de membrana (Galluzzi y col, 2012;

Vanlangenakker y col, 2012). Hay que tener en cuenta que el daño producido por estos agentes no se limita únicamente a la necrosis regulada, puesto que estos mismos estímulos, en función del contexto celular, pueden inducir otros mecanismos de muerte tales como la apoptosis.

La definición de necrosis regulada se basa fundamentalmente en criterios descriptivos morfológicos, como la fragmentación y condensación de la cromatina, así como en la ausencia de eventos asociados con otras rutas de muerte o la no activación de ciertas proteínas como las caspasas. Desde un punto de vista bioquímico, las proteínas implicadas en la necrosis programada están relacionadas también con otros programas de muerte, tanto dependientes como independientes de caspasas, por lo que no es posible diferenciar la necrosis programada en base a la activación de una única proteína. El método más empleado para caracterizar la necrosis programada, está basado en el análisis de la permeabilidad de la membrana y la exposición de PS (Baritaud y col, 2010). En las rutas apoptóticas clásicas, tanto dependientes como independientes de caspasas, existe un desfase entre la translocación de la PS y la pérdida de la integridad de membrana, por lo que en las fases iniciales del proceso de muerte celular, se observa un marcaje positivo para PS y negativo para IP. Por el contrario, en la necrosis programada, el intervalo entre ambos eventos es muy corto, observándose mayoritariamente un marcaje doble (Moubarak y col, 2007; Artus y col, 2010). Las células que entran en necrosis regulada pueden ser eficientemente fagocitadas, lo que indica que la translocación de PS no es un artefacto debido a difusión pasiva (Boujrad, 2007). Otro método habitualmente empleado para caracterizar las células necróticas es el uso del ensayo TUNEL junto a anticuerpos anticaspasa-3. Tradicionalmente se considera que las células positivas para TUNEL y negativas para caspasa-3 han sufrido un proceso de necrosis regulada (Vanlangenakker y col, 2012), aunque como hemos visto en la introducción, también existen procesos apoptóticos independientes de caspasas. Por tanto, no existe un método único para determinar la necrosis regulada, siendo necesario combinar diversas técnicas antes de poder determinar el tipo de muerte preciso que se produce.

Dentro de los distintos mecanismos de necrosis regulada, el más estudiado es la necroptosis (Galluzi y col, 2012; Yoshida y col, 2012; Christofferson y Yuan, 2010). Se trata de un mecanismo de muerte activado por la unión de determinados ligandos a receptores de membrana de la familia TNFR. Se caracteriza por combinar elementos propios de la apoptosis, como la condensación y fragmentación de la cromatina, ensayo TUNEL positivo, externalización de PS y liberación del citocromo c; y de la necrosis, como la rápida ruptura de la membrana plasmática y los orgánulos (Asare y col, 2009; Yoshida y col, 2012).

La necroptosis se considera un mecanismo de seguridad para asegurar la eliminación de las células en las que la apoptosis está inhibida, y han sufrido daños por condiciones de estrés. En este proceso interviene 2 kinasas que juegan un papel fundamental, RIP-1 y -3. TNFR interviene en la activación de NF- κ B, que promueve la supervivencia celular, y en la apoptosis extrínseca (Micheau y Tschoop, 2003; Declercq y col, 2009). En ambos casos, RIP-1 forma complejos multiméricos con TNFR y otras proteínas. Sin embargo, ante determinados estímulos, especialmente cuando la caspasa-8 está inhibida, RIP-1 sufre un proceso de desubiquitinización, y se va a unir a RIP-3 formando el complejo IIb o necrosoma, que desencadena la necroptosis (Cho y col, 2009). Esta unión puede ser inhibida por la necrostatina-1 (Nec-1), un compuesto que bloquea la actividad kinasa de RIP-1 sin afectar a sus otras funciones, por lo que se considera un inhibidor bastante específico de la necroptosis (Degterev y col, 2005). Sin embargo, recientes estudios realizados con mutante knockouts de RIP-1, han mostrado que en estas células carentes de RIP-1, la necrostatina también era capaz de inhibir la necroptosis (Cho y col, 2011), lo que sugiere que la Nec-1 es capaz de interaccionar con otras moléculas implicadas en el proceso.

Una vez formado el necrosoma, RIP-3 es capaz de interactuar con ciertas enzimas bioenergéticas, como la glutamato-amonio ligasa (GLUL), la glutamato deshidrogenasa (GLUD 1) y la glicógeno fosforilasa (PYGL), y potenciar su actividad catalítica, lo que genera un incremento del metabolismo energético y por tanto, un aumento de la producción de ROS, provocando la necroptosis (Zhang y col, 2009). Dichas ROS se han descrito

como ejecutoras de este mecanismo en determinados tipos celulares (Lin y col, 2004). La mitocondria también parece intervenir en el proceso, donde la transición de permeabilidad de este orgánulo es decisiva (Christofferson y Yuan, 2010). Sin embargo, los mecanismos de integración de todas estas señales aún no se conocen.

En el campo de la TFD, muy pocos trabajos han abordado el estudio de la necrosis regulada en respuesta a los tratamientos fotodinámicos. Sin embargo, un estudio reciente realizado con células de glioblastoma sometidas a TFD con 5-ALA, apunta a que la necroptosis puede tener lugar sin que se produzca unión de ningún ligando a TNFR. En este caso, el estímulo inductor sería el oxígeno singlete producido por el tratamiento fotodinámico, el cual se origina en la mitocondria e induce la formación del complejo RIP1-3, si bien el mecanismo que interrelaciona ambos eventos no se conoce. RIP 3 pasa de estar disperso por el citoplasma a formar agregados que colocalizan con RIP1 pero no con ningún orgánulo (Coupienne y col, 2011a). Todo esto apunta a que se puede desencadenar un proceso necroptótico en respuesta a estímulos intracelulares. Otro estudio de este grupo, realizado también con 5-ALA en célula U2OS, apoya esta idea y propone que la presencia o ausencia de RIP-3 determina el tipo de mecanismo de muerte que se produce (Coupienne y col, 2011b).

A la vista de todos estos datos, y puesto que las células tratadas 3 h con ZnPc presentan varias de las características asociadas con la necroptosis: TUNEL positivo, translocación del cit C y rápida pérdida de la integridad de la membrana plasmática; decidimos evaluar la posible implicación de la necroptosis, en la inactivación celular en respuesta a los tratamientos fotodinámicos con ZnPc en células HeLa. Para ello utilizamos el inhibidor Nec-1, que como hemos comentado, es una molécula ampliamente usada para estudiar este mecanismo de muerte celular.

Los ensayos de supervivencia realizados en células HeLa, mostraron que la Nec-1 sola no altera la viabilidad celular, bajo ninguna de las condiciones experimentales estudiadas. La presencia del inhibidor tampoco modificaba el efecto fotodinámico de la ZnPc. Las células tratadas con el FS, en presencia

de cualquiera de las concentraciones de Nec-1 estudiadas, mostraban una inactivación celular cercana al 100%, de forma análoga a la observada en las células tratadas solo con ZnPc.

Por el contrario, a nivel morfológico, la presencia de Nec-1 provocaba un cambio en la morfología nuclear de las células incubadas 3 h con ZnPc e irradiadas posteriormente, observándose un descenso del número de células con la cromatina condensada formando gránulos y un incremento del número de núcleos necróticos. Este cambio era dependiente de concentración: las células tratadas con ZnPc en presencia de concentraciones de Nec-1 inferiores a 150 μM , presentaban un núcleo granulado en más del 80% de los casos, de forma similar a la observada en células tratadas solo con ZnPc. Por el contrario, al incrementar la concentración de Nec-1 por encima de 150 μM , se observa que el número de núcleos granulados decae, hasta ser inferior al 20% con concentraciones de Nec-1 superiores a 300 μM .

En las células incubadas con ZnPc durante 1 h, la presencia de Nec-1 no alteraba la supervivencia ni morfología celular con respecto a las células tratadas solo con el FS, observándose una inactivación cercana al 100%, por un proceso de tipo necrótico en todos los casos.

Estos resultados confirman que el mecanismo de muerte inducido por la ZnPc después de 3 h de incubación es la necrosis regulada, concretamente la necroptosis. La presencia de Nec-1, pese a no prevenir la muerte celular inducida por la ZnPc, si altera el tipo de mecanismo de muerte. La Nec-1, al impedir la formación del necrosoma, bloquea la cascada de reacciones que llevan a un proceso de necrosis regulada y que culminan con la fragmentación y condensación de la cromatina en forma de gránulos, aunque las ROS generadas durante el tratamiento fotodinámico producen la inactivación celular por un proceso necrótico clásico, análogo al observado con tratamientos de 1 h con ZnPc. Dado que los eventos moleculares en respuesta a los tratamientos fotodinámicos son prácticamente idénticos en células HeLa y A-549, parece lógico asumir que el mecanismo de inactivación celular es el mismo en las dos líneas celulares, aunque sería necesario un estudio más profundo para evaluar el papel que juega la activación de la

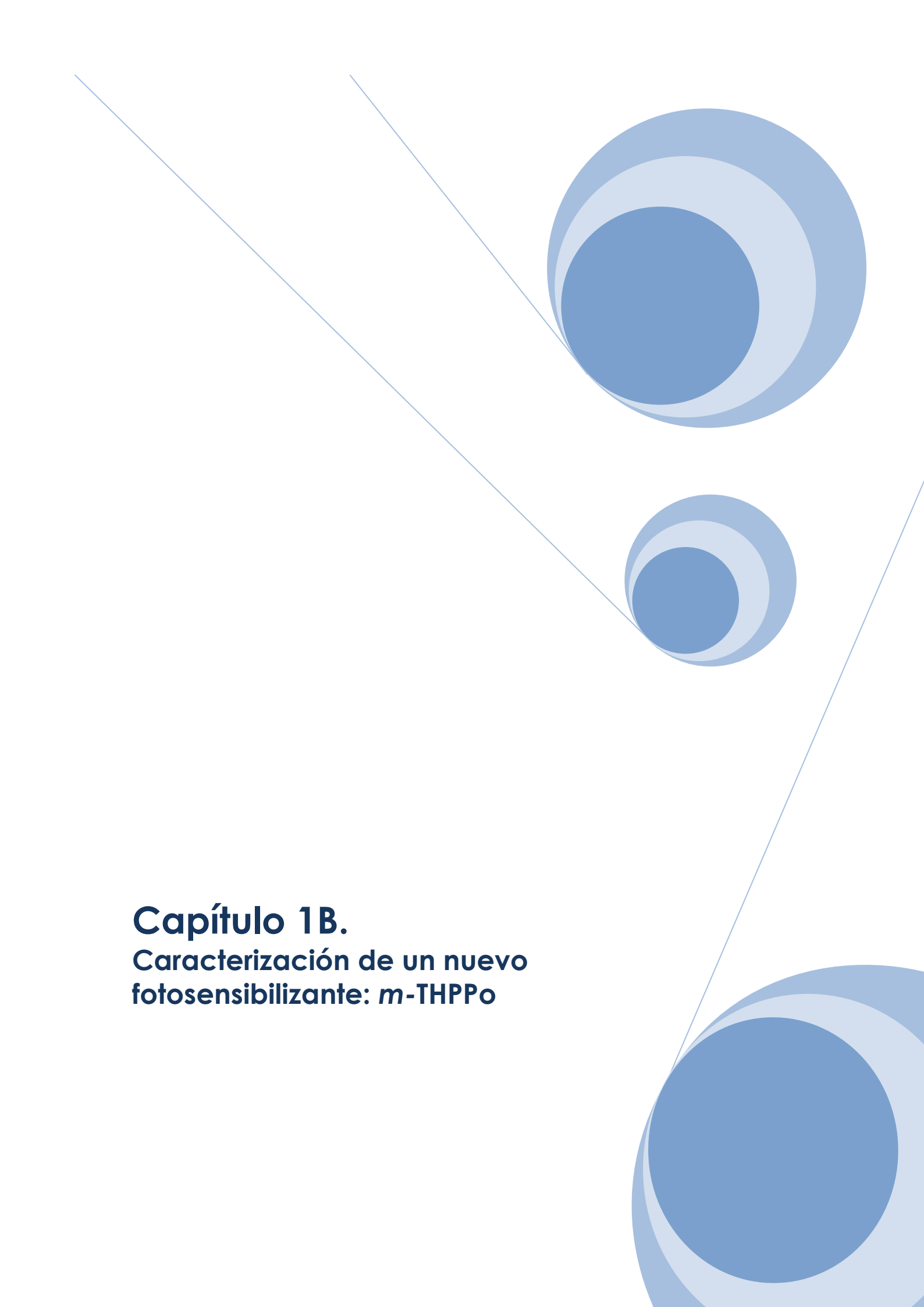
caspasa-2 en células A-549 y para determinar los eventos intermedios que se producen entre la formación del necrosoma, y la fragmentación y condensación de la cromatina.

1A.5. Conclusiones

En este estudio hemos caracterizado el mecanismo de muerte celular inducida por el FS ZnPc en células HeLa y A-549, en función del tiempo de incubación. Los resultados muestran que en ambos tipos celulares, la incubación en presencia del FS durante 1 h, seguida de 10 min de irradiación, induce la muerte celular por un mecanismo de tipo necrótico "clásico".

Por el contrario, las células incubadas durante 3 h con ZnPc sufren una inactivación por un mecanismo de necrosis regulada, concretamente necroptosis, tal como confirman los estudios realizados con el inhibidor de esta ruta, la necrostatina-1. Los cambios morfológicos y eventos moleculares descritos en las dos líneas celulares son equivalentes, salvo en el caso de la activación de la caspasa-2, que solo se produce en células A-549.

Este trabajo es uno de los primeros en los que se describe un proceso necrótico regulado en respuesta a la TFD y pone de manifiesto que variando las condiciones de tratamiento, el tiempo de incubación en este caso, que determina la localización subcelular de la droga, es posible inducir distintos mecanismos de muerte, lo que puede ser importante a la hora de desarrollar tratamientos más eficaces y personalizados.

An abstract graphic design featuring three blue circles of varying sizes. The top circle is the largest, the middle one is smaller, and the bottom one is the smallest. They are arranged along a diagonal line that runs from the top left towards the bottom right. The circles have a layered, 3D effect with different shades of blue. Thin blue lines extend from the top left corner towards the circles, and another line extends from the bottom right corner towards the bottom circle.

Capítulo 1B.

Caracterización de un nuevo
fotosensibilizante: *m*-THPPo

1B.1. Resumen:

Hemos caracterizado un nuevo FS, el *m*-tetrahidroxifenil-porficeno (*m*-THPPo o temoceno). Se trata de un porficeno con una estructura análoga a la de la temoporfina (Foscan®) (Fig. 1). Con este porficeno se comparó el efecto que tienen los tratamientos fotodinámicos, sobre los cultivos de células HeLa, en función del sistema de vehiculización del *m*-THPPo, que se utilizó disuelto en DMSO o incluido en liposomas. Se estudió la localización subcelular del porficeno y se realizaron diversos ensayos para determinar el tipo de mecanismo de muerte implicado: TUNEL, ANV/IP, H-33258 y AT. También se evaluó el orgánulo subcelular que iniciaba el proceso apoptótico mediante inmunofluorescencia indirecta para citocromo C y para caspasa-2.

Los resultados indican que con ambos vehiculizantes, el mecanismo predominante era la apoptosis, aunque en células tratadas con *m*-THPPo disuelto en DMSO, la rápida deslocalización del citocromo C indica que se trata de un proceso apoptótico de tipo intrínseco, mientras que con el FS incluido en liposomas, la apoptosis ocurre por una vía independiente de este orgánulo.

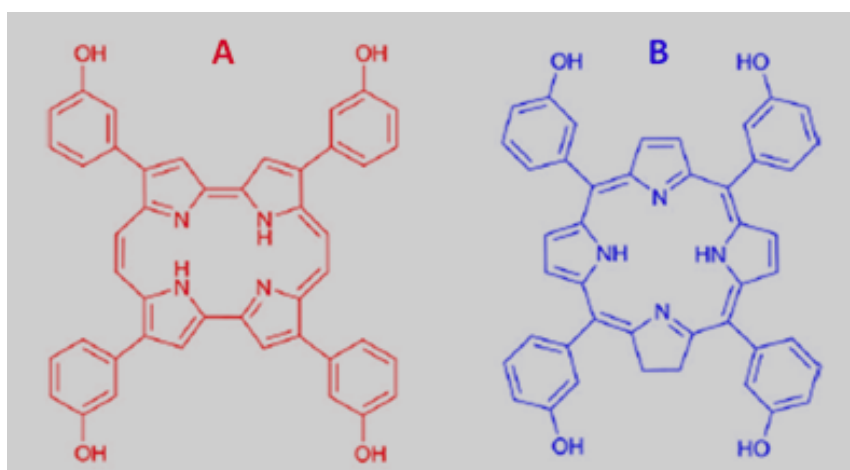


Figura 1. Estructura química del Temoceno (A) y la Temoporfina (B) (García-Díaz y col, 2011. Med Chem Commun 7:616-619.)

1B.2. Objetivos:

Los objetivos de este trabajo fueron:

- Valorar la capacidad fotosensibilizante del *m*-THPPo, incluido en dos vehiculizantes distintos (disuelto en DMSO o incluido en liposomas), sobre los cultivos de células HeLa.
- Determinar los mecanismos de muerte celular inducidos por los tratamientos fotodinámicos con este FS.
- Estudiar el efecto que tiene el sistema de vehiculización en el que se administra este porfírico, sobre su localización celular y las rutas de muerte que desencadena.

1B.3. Resultados

1B.3.1. Propiedades fotofísicas del *m*-THPPo

La síntesis y caracterización fotofísica de este nuevo FS fueron realizadas por el grupo dirigido por el Dr S. Nonell, con el que colabora nuestro grupo de investigación. Para llevar a cabo esta caracterización, el *m*-THPPo se disolvió en tetrahidrofurano (THF). En la figura 2 se observa el espectro de absorción y de emisión de este FS. El *m*-THPPo presenta el típico espectro de absorción de las porfíricenas, con una banda de Soret en la región del ultravioleta y con tres bandas bien definidas en la región roja del espectro, que presentan un coeficiente máximo de absorción en esta zona de $70000 \text{ } \epsilon/\text{M}\cdot\text{cm}$ a 656 nm. Este valor es 2,5 veces mayor que el presenta su análogo, la *m*-tetrahidroxifenil-clorina (*m*-THPC o Foscan®), a la misma longitud de onda (λ). En cuanto al espectro de emisión, también se corresponde con el típico de los porfíricenas, presentando una banda de emisión con un máximo a 666 nm.

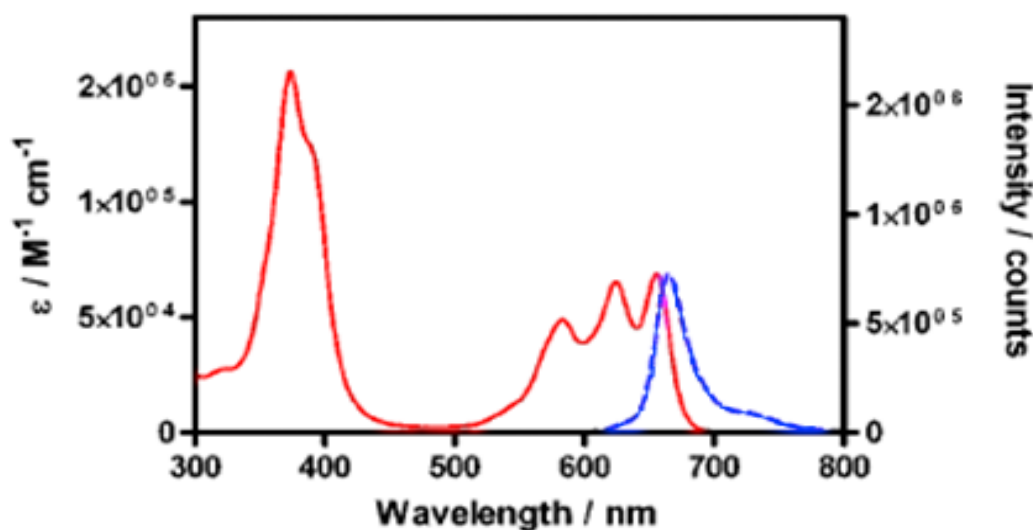


Figura 2. Espectro de absorción (rojo) y de emisión (azul) del *m*-THPPo disuelto en THF (García-Díaz y col, 2011. Med Chem Commun 7:616-619.).

En la tabla 1 se presenta un resumen de las propiedades fotofísicas del *m*-THPPo comparadas con las de la *m*-THPC (disuelto en metanol). El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) del *m*-THPPo es 0,084, lo que le hace apropiado para su utilización para fines diagnósticos. El *m*-THPPo tarda en decaer desde su estado singlete excitado 2,3 ns y su vida media en estado triplete es 260 μs , lo que le confiere unas propiedades fotoquímicas adecuadas para su

aplicación en TFD. Además, el *m*-THPPo es capaz de producir $^1\text{O}_2$ en condiciones aerobias, tal como indica el rendimiento cuántico ($\Phi_{\Delta}=0,10$), que es lo suficientemente alto como para producir una elevada fototoxicidad celular.

Tabla 1. Propiedades fotofísicas del *m*-THPPo y su análogo,

	<i>m</i> -THPPo/THF	<i>m</i> -THPC/metOH
^a $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	656	650
^b $\lambda_{\text{F}}/\text{nm}$	666, 729	653, 720
^c $\tau_{\text{s}}/\text{ns}$	2.3	8,5
^d Φ_{F}	0.084	0.089
^e Φ_{Δ}	0.10	0.43

^a Máximo de la banda de absorbancia. ^b Máximo de la banda de emisión. ^c Vida media en estado singlete. ^d Rendimiento cuántico de fluorescencia. ^e Rendimiento cuántico del oxígeno singlete.

Finalmente, en la figura 3 observamos que bajo las mismas condiciones de irradiación, el *m*-THPPo presenta una estabilidad sustancialmente mayor que su análogo, la *m*-THPC.

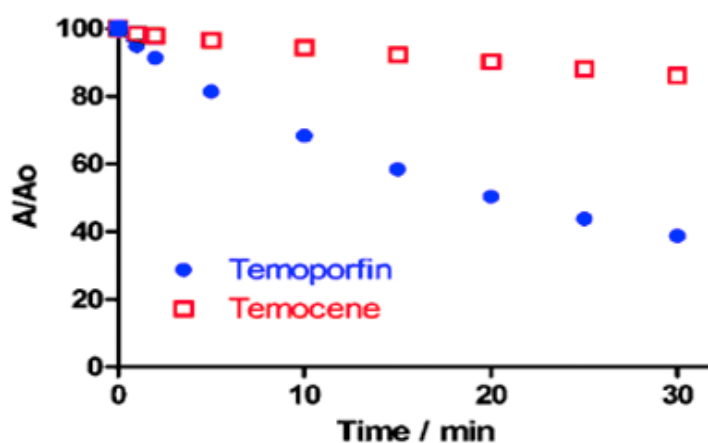


Figura 3. Photobleaching de la temoporfin y el temoceno disueltos en acetona e irradiados con pulsos laser de 532 nm. Los valores de absorbancia se midieron a 650 y 656 nm respectivamente (García-Díaz y col, 2011. Med Chem Commun 7:616-619.).

1B.3.2. Caracterización del *m*-tetrahidroxifenil-porficeno (*m*-THPPo) disuelto en DMSO

1B.3.2.1. Supervivencia celular

Las variaciones en la supervivencia de las células HeLa, incubadas con distintas concentraciones de *m*-THPPo disuelto en DMSO (*m*-THPPo-DMSO) durante 24 h, se muestran en la figura 4.

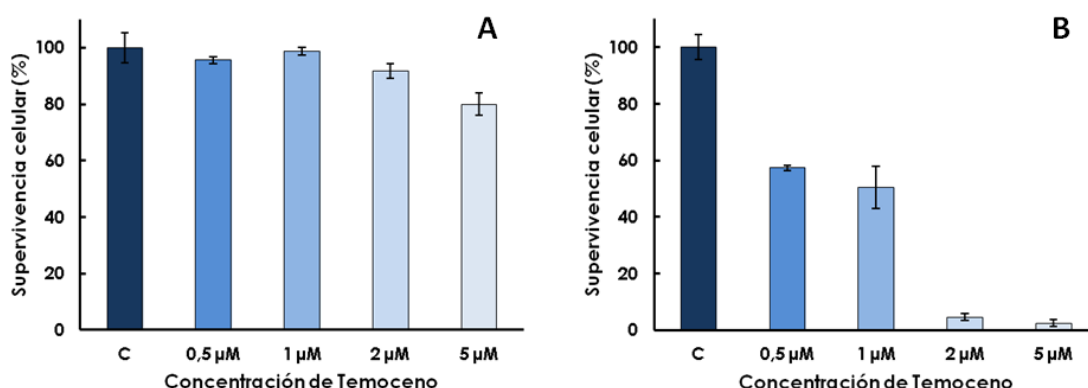


Figura 4. Supervivencia de las células HeLa, incubadas con distintas concentraciones de *m*-THPPo-DMSO durante 24 h. **A:** en ausencia de irradiación. **B:** células irradiadas 15 min con luz roja. Los datos corresponden a la media y la DE de tres experimentos independientes.

En ausencia de irradiación (Fig. 4A), solo las células tratadas con *m*-THPPo-DMSO 5 μM sufren un ligero descenso de la viabilidad del 20%. El resto de las concentraciones estudiadas, no producen cambios significativos en la viabilidad celular con respecto a los controles.

Por el contrario, las células incubadas con *m*-THPPo-DMSO e irradiadas 15 min (Fig. 4B) sufren un descenso de la supervivencia, dependiente de la concentración de FS administrada. En los tratamientos con concentraciones 0,5 y 1 μM, se observa un descenso de la viabilidad del 50% aproximadamente, mientras que concentraciones superiores provocan una inactivación celular cercana al 100%.

1B.3.2.2. Localización subcelular

Se estudió la localización subcelular del *m*-THPPo-DMSO después de 24 h de incubación. En la figura 5 podemos observar los resultados obtenidos.

Con todas las concentraciones estudiadas era posible observar la fluorescencia roja del FS en el citoplasma celular (Fig. 5B-D), colocalizando con las mitocondrias, que presentan una morfología filamentosa, aunque también se podía observar una fluorescencia difusa del *m*-THPPo-DMSO en el citoplasma de las células. La incubación con el FS, seguida de la tinción de estos orgánulos con la sonda Mitotracker® Green, confirma esta localización (Fig. 5D-F).

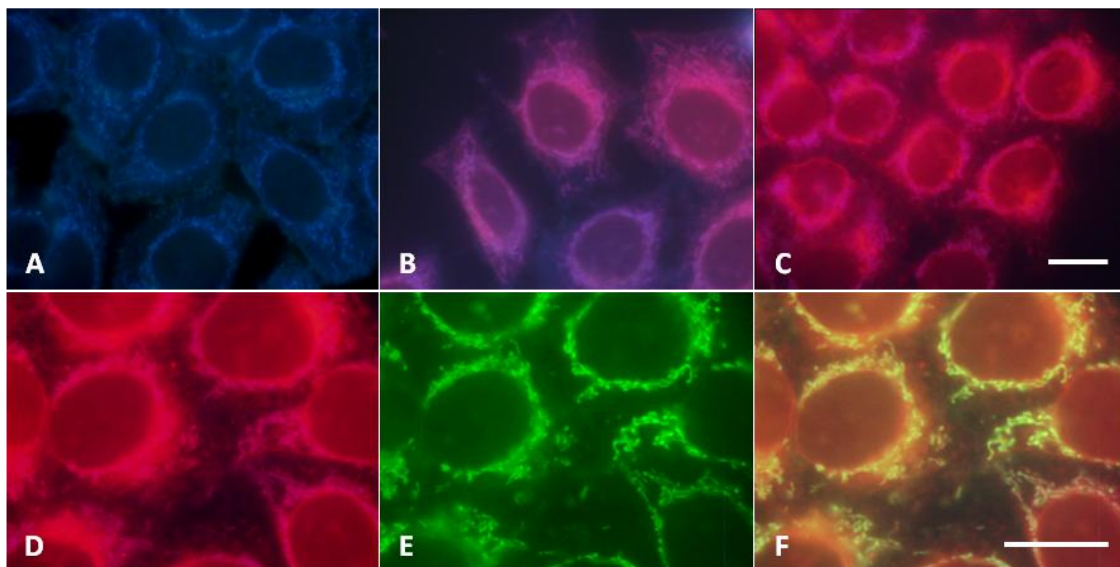


Figura 5. Células HeLa, observadas en microscopía de fluorescencia bajo excitación UV. **A:** células control. **B y C:** células incubadas durante 24 h con *m*-THPPo-DMSO 2 y 5 μ M, respectivamente. **D-F:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-DMSO 10 μ M y teñidas con Mitotracker Green®: **D:** células observadas con excitación UV. **E:** las mismas células observadas con excitación azul. **F:** ambas imágenes superpuestas. Barra de escala: 20 μ m

1B.3.2.3. Morfología nuclear

Se evaluaron los cambios producidos por los tratamientos fotodinámicos sobre la morfología nuclear, para lo que se procesaron las células con H-33258, 24 h después de los tratamientos. En ausencia de irradiación, las células tratadas con cualquiera de las concentraciones del FS, presentaban una morfología equivalente a la observada en los controles (Fig. 6A). Las células tratadas con *m*-THPPo-DMSO 0,5 y 1 μ M e irradiadas (Fig. 6B), mostraban una morfología similar, encontrándose colonias de células vivas rodeadas de núcleos con una morfología de tipo apoptótico. En los tratamientos con concentraciones superiores a 2 μ M (Fig. 6C), el número de células vivas era muy bajo, predominando los núcleos con morfología tanto necrótica como apoptótica.

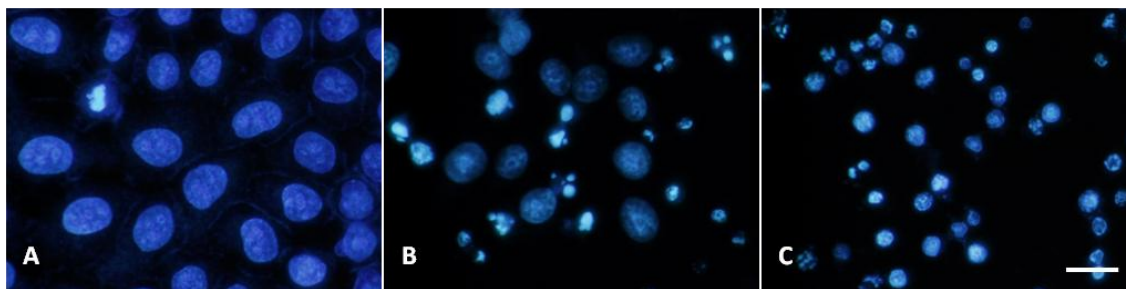


Figura 6. Células HeLa fijadas 24 h después de los tratamientos fotodinámicos y procesadas con H-33258. **A:** células control. **B:** células tratadas con *m*-THPPo 1 μ M durante 24 h e irradiadas 15 min. **C:** células tratadas con *m*-THPPo 2 μ M durante 24 h e irradiadas 15 min. Barra de escala: 20 μ m.

1B.3.3. Caracterización del *m*-THPPo incluido en liposomas (*m*-THPPo-lip).

Una vez estudiado el efecto del *m*-THPPo disuelto en DMSO en los cultivos celulares de HeLa, se realizó la caracterización del FS incluido en liposomas.

1B.3.3.1. Encapsulación del *m*-THPPo en liposomas de nueva formulación

La encapsulación del *m*-THPPo-lip, así como la síntesis y caracterización de estos nuevos liposomas, fue llevada a cabo por el grupo de investigación dirigido por la Dra. M Mora de la Universidad de Barcelona, que también forma parte de nuestro proyecto de investigación. La mezcla de fosfolípidos utilizada fue de difosfatidil-colina (DPPC) y dimirostoilfosfatidil-glicerol (DMPG), en una proporción 9:1.

Se evaluó el estado de agregación del *m*-THPPo dentro de la bicapa liposomal en función de la proporción molar de *m*-THPPo/DPPC/DMPG (Fig. 7). Los mejores resultados se obtuvieron con la siguiente formulación: 1:67,5:7,5. En los liposomas con un menor contenido lipídico, el espectro presentaba bandas adicionales y unas bandas Q poco definidas, lo que se corresponde con la presencia de agregados, por lo que para experimentos sucesivos se seleccionó esta formulación, que presentaba la mejor concentración del FS dentro de la bicapa lipídica: 16 μ M.

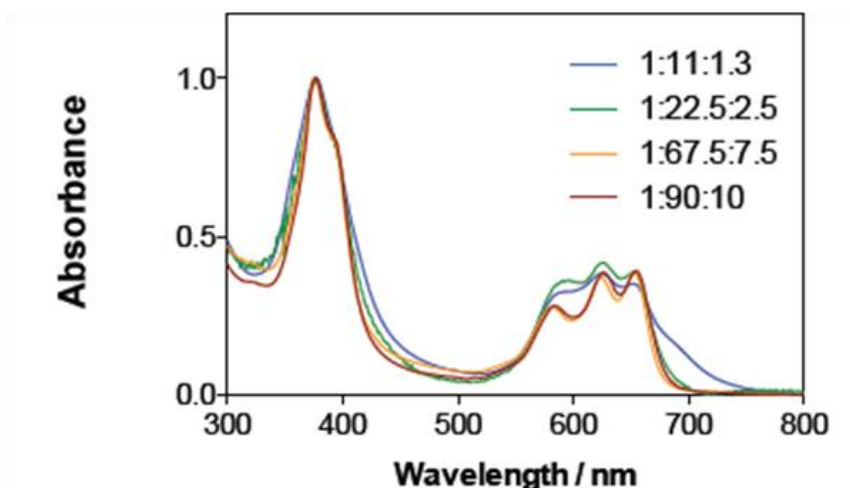


Figura 7. Espectro de absorción del *m*-THPPo encapsulado en distintas formulaciones liposomales (Soriano y col, 2013. Biochim Biophys Acta DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.05.021).

1B.3.3.2. Propiedades fotofísicas

En la tabla 2 observamos las propiedades fotofísicas del *m*-THPPo-lip. En comparación con los resultados descritos antes para el FS libre, se observa un descenso de los rendimientos cuánticos de fluorescencia y del oxígeno singlete, así como de la vida media del FS en estado singlete, lo que sugiere que los liposomas modifican las propiedades fotofísicas del *m*-THPPo.

Tabla 2. Propiedades fotofísicas del *m*-THPPo encapsulado en liposomas. (Soriano y col. 2013. Biochim Biophys Acta DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.05.021)

	m-THPPo/ DPPC/DMPG
^a $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	653
^b $\lambda_{\text{F}}/\text{nm}$	664,721
^c $\tau_{\text{s}}/\text{ns}$	1,6
^d Φ_{F}	0.02
^e Φ_{Δ}	0.082

^a Máximo de la banda de absorbancia. ^b Máximo de la banda de emisión. ^c Vida media en estado singlete. ^d Rendimiento cuántico de fluorescencia. ^e Rendimiento cuántico del oxígeno singlete.

1B.3.3.3. Supervivencia celular

Se evaluó la fotocitotoxicidad del *m*-THPPo-lip en células HeLa. En la figura 8 observamos la supervivencia de las células HeLa incubadas con distintas concentraciones del FS.

En ausencia de irradiación (Fig. 8A), ninguna de las concentraciones estudiadas afecta a la viabilidad celular, que se mantiene en unos valores similares a la de los controles.

Por el contrario, las células tratadas con *m*-THPPo-lip e irradiadas 15 min con luz roja (Fig. 8B), presentan un descenso de la supervivencia celular dependiente de la concentración del porfíceno. Los tratamientos con *m*-THPPo-lip 0,5 μ M, reducen la supervivencia celular en un 15%, mientras que las incubaciones con el FS a una concentración de 1 o 2 μ M producen una letalidad del 40 y 65% respectivamente. Finalmente, las células tratadas con *m*-THPPo-lip 5 μ M presentan una supervivencia inferior al 20%.

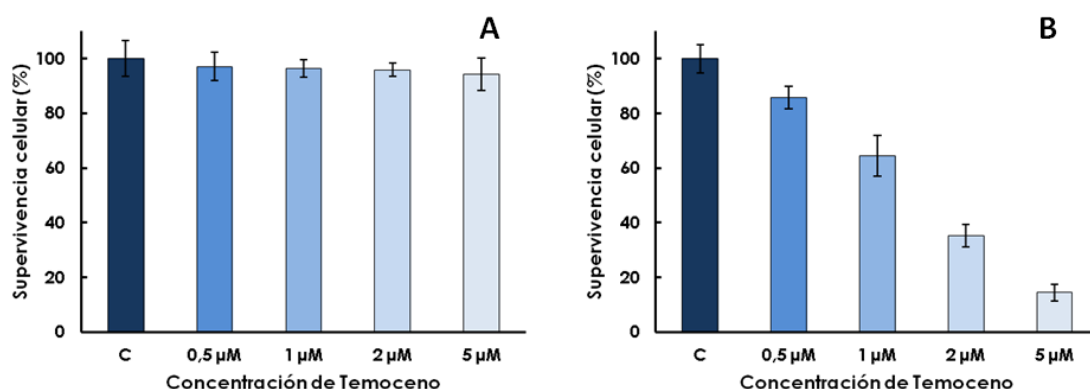


Figura 8. Supervivencia de las células HeLa, incubadas con distintas concentraciones de *m*-THPPo-lip durante 24 h. **A:** en ausencia de irradiación. **B:** células irradiadas 15 min con luz roja. Los datos corresponden a la media y la DE de tres experimentos independientes.

1B.3.3.4. Localización subcelular

En la figura 9, observamos la localización subcelular del FS incluido en liposomas en células HeLa. Las células incubadas con *m*-THPPo-lip 2 μ M mostraban en su interior la fluorescencia roja del FS (Fig. 9B), aunque dicha emisión era débil. Utilizando concentraciones inferiores de droga, no era posible detectar el porfíceno en el interior de las células, que presentaban un aspecto análogo al de los controles (Fig. 9A). Las células incubadas con *m*-

THPPo-lip a una concentración 5 μM (Fig. 9C), presentan una intensa fluorescencia roja, localizada tanto en posición perinuclear como en gránulos dispersos por el citoplasma. La incubación de las células con *m*-THPPo-lip, seguida de la incubación con la sonda LysoTracker® Green (Fig. 8D-F), confirmó que dicha localización se corresponde mayoritariamente con los lisosomas.

Para los experimentos sucesivos, se seleccionó la concentración de *m*-THPPo-lip 5 μM , puesto que era la que producía una mayor inactivación celular y presentaba una localización subcelular más evidente.

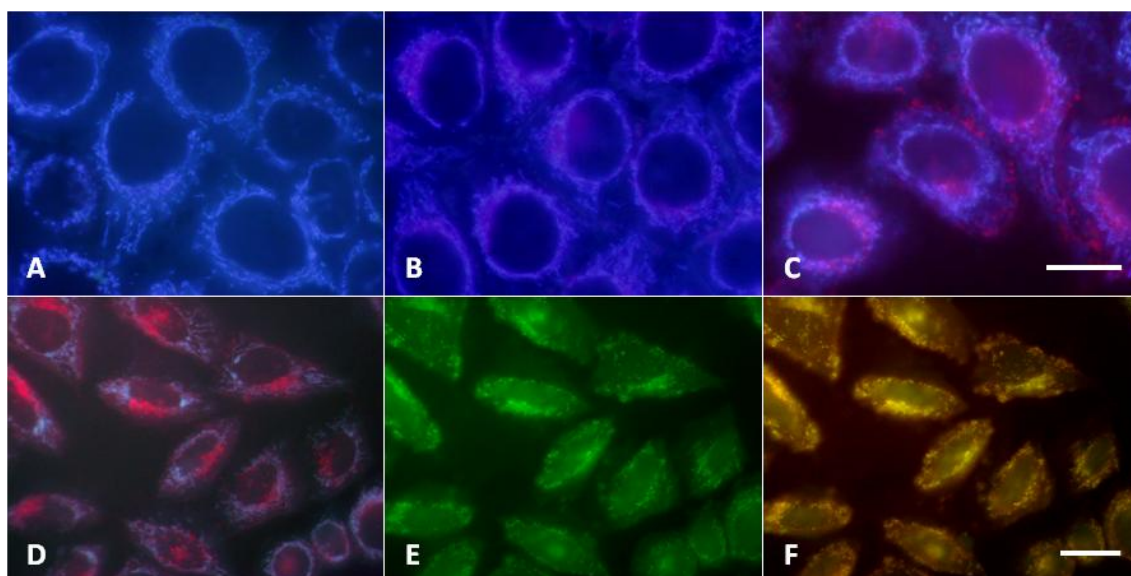


Figura 9. Células HeLa, observadas en microscopía de fluorescencia bajo excitación UV. **A:** células control. **B y C:** células incubadas durante 24 h con *m*-THPPo-lip 2 y 5 μM , respectivamente. **D-F:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-DMSO 5 μM y teñidas con LysoTracker Green®: **D:** células observadas con excitación UV. **E:** las mismas células observadas con excitación azul. **F:** ambas imágenes superpuestas. Barra de escala: 20 μm

1B.3.3.5. Morfología celular

Los cambios morfológicos producidos por los tratamientos fotodinámicos con *m*-THPPo-lip, se evaluaron mediante tinción con azul de toluidina (Fig. 10).

Inmediatamente después de irradiar (Fig. 10B) las células presentan una morfología nuclear equivalente a la de los controles (Fig. 10A) pero en el citoplasma podemos observar la presencia de numerosas vacuolas. Tres horas después de la irradiación (Fig. 10C), el tamaño de estas vacuolas es mayor y además se observa la presencia de células con un aspecto estrellado,

morfología típica de los procesos apoptóticos. Después de 6 h desde los tratamientos fotodinámicos (Fig. 10D), el número de células apoptóticas se incrementa, mientras que el de células con el citoplasma vacuolizado decae. Finalmente, 24 h después de irradiar, la mayoría de las células presentan el núcleo formando cuerpos apoptóticos.

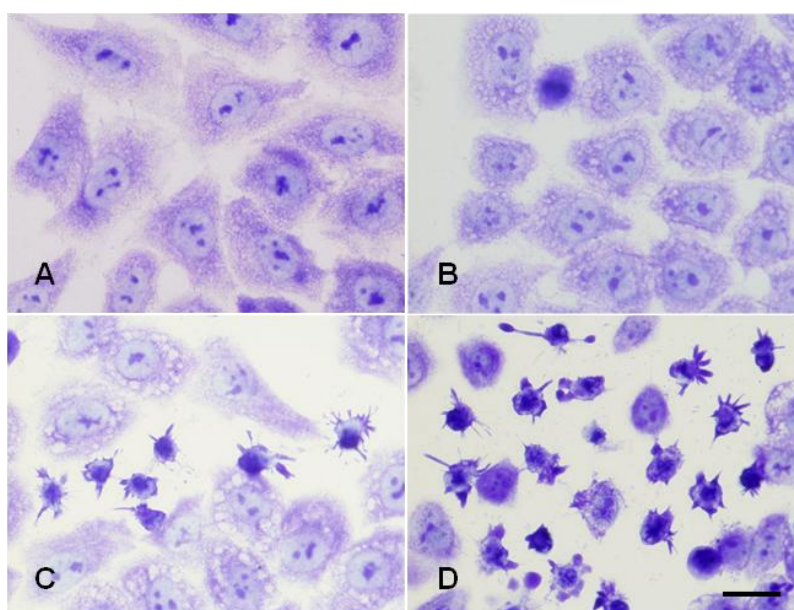


Figura 10. Células HeLa incubadas 24 h con *m*-THPPo-lip 5 μ M, irradiadas 15 min y procesadas para AT a distintos tiempos postirradiación. **A:** células control. **B:** células procesadas inmediatamente después de irradiar. **C y D:** células teñidas 3 y 6 h después de los tratamientos fotodinámicos, respectivamente. Barra de escala: 20 μ m.

1B.3.3.6. Morfología nuclear

En la figura 11 observamos la evolución de la morfología nuclear, después de 24 h de incubación con *m*-THPPo-lip 5 μ M y 15 min de irradiación. Inmediatamente después de irradiar (Fig. 11B), los núcleos interfásicos presentan una morfología equivalente a la de los controles (Fig. 11A), aunque era posible observar meta-anafases con una morfología aberrante (*). La formación de cuerpos apoptóticos comienza a ser evidente 6 h después de irradiar (Fig. 11C) y culmina en una morfología predominantemente apoptótica 24 h después (Fig. 11D).

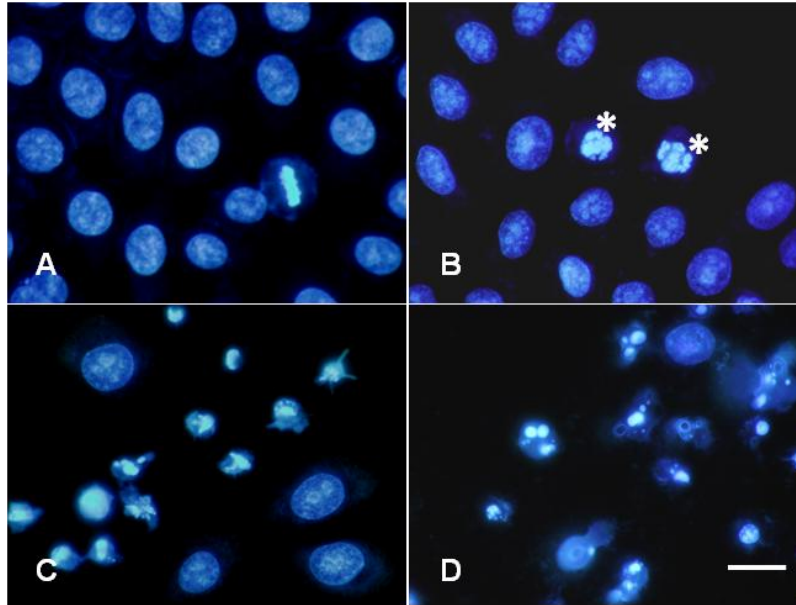


Figura 11. Células incubadas 24 h con *m*-THPPo-lip 5 μ M, irradiadas 15 min y procesadas para H-33258 a distintos tiempos postirradiación. **A:** células control. **B:** células procesadas inmediatamente después de irradiar, (*) mitosis aberrantes. **C:** células teñidas 6 h después de los tratamientos fotodinámicos. **D:** células procesadas 24 h después los tratamientos. Barra de escala: 20 μ m.

En la tabla 3 observamos el índice mitótico (IM) y el porcentaje de meta-anafases anormales, en función del tiempo transcurrido después de los tratamientos fotodinámicos, que producen un descenso progresivo del índice mitótico, cayendo de un 5,5% inmediatamente después de irradiar, hasta un 0,6% a las 6 h de finalizar la incubación. Por otro lado, este descenso del IM viene acompañado de un incremento en el número de fases mitóticas aberrantes. Mientras que en los controles el número de fases anómalas es del 10%, inmediatamente después de irradiar se observa un 50% de meta-anafases con la morfología alterada. El número de fases aberrantes continua aumentando a tiempos postincubación más largos, hasta alcanzar el 90% a las 6 h. En las preparaciones fijadas a tiempos superiores a 6 h después de los tratamientos, el número de células vivas era demasiado pequeño para realizar recuentos, aunque la práctica totalidad de las fases que encontramos a las 24 y 48 h después de los tratamientos, presentaban alteraciones.

Tabla 3. Porcentaje de meta-anafases aberrantes e índice mitótico, en función del tiempo transcurrido (Δt) después de los tratamientos fotodinámicos con *m*-THPPo-lip.

Δt	Meta-anafases aberrantes (%)	IM (%)
Control	10,5 \pm 3,2	5,9 \pm 0,75
0 h	50,08 \pm 3,9	5,5 \pm 0,64
1 h	57,9 \pm 0,4	4,2 \pm 0,45
3 h	68,8 \pm 2,1	2,3 \pm 0,06
6 h	92,4 \pm 7,2	0,6 \pm 0,06

Los datos corresponden a la media \pm la desviación estándar (DE) de tres experimentos distintos. Al menos 3000 células fueron contadas en cada caso.

1B.3.4. Mecanismos de muerte celular

Una vez caracterizado el efecto del *m*-THPPo incluido en ambos vehiculizantes, se realizaron una serie de experimentos para determinar el mecanismo de muerte que interviene en ambos casos, centrándonos en el FS incluido en liposomas, puesto que valorar esta formulación liposomal era uno de los objetivos de este trabajo de investigación. Para estas pruebas se seleccionó el tratamiento con *m*-THPPo-lip 5 μ M, que producía una reducción de la supervivencia superior al 80%, por un proceso de morfología apoptótica, mientras que el *m*-THPPo-DMSO se utilizó a una concentración 1 μ M, que produce una inactivación por un mecanismo morfológicamente similar al que observamos con el *m*-THPPo-lip.

1B.3.4.1. Ensayo TUNEL

Se realizó el ensayo TUNEL para detectar la fragmentación del ADN asociada a los procesos apoptóticos (Fig. 12). En los controles no se observa marcaje positivo (Fig. 12A y 12B), observándose únicamente un ligero fondo verde. Por el contrario, las células incubadas con *m*-THPPo, tanto disuelto en DMSO a una concentración 1 μ M (Fig. 12C y 12D), como incluido en liposomas (Fig. 12E y 12F), resultan positivas para el ensayo TUNEL 3 h después de irradiar, mostrando una intensa fluorescencia nuclear que confirma la fragmentación del ADN.

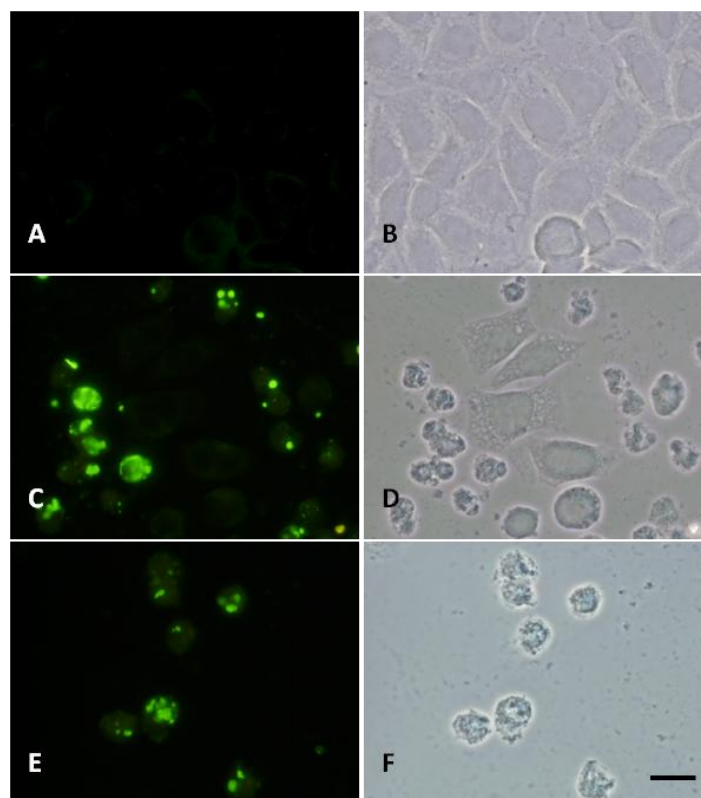


Figura 12. Células HeLa procesadas para el ensayo TUNEL, 3 h después de los tratamientos fotodinámicos. **A:** células control. **B:** el mismo campo observado en microscopía de campo claro. **C:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-DMSO 1 μ M e irradiadas 15 min. **D:** las mismas células observadas en campo claro. **E:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-lip 5 μ M e irradiadas 15 min. **F:** las mismas células observadas en campo claro Barra de escala 20 μ m.

1B.3.4.2. Ensayo annexina V/ioduro de propidio (ANV/IP)

En la figura 13 observamos los resultados obtenidos con el ensayo ANV/IP, realizado a distintos tiempos después de la irradiación. Las células tratadas tanto con *m*-THPPo-lip (Fig. 13C) como con *m*-THPPo-DMSO (Fig. 13G), presentaban 30 min después de irradiar un marcaje verde en la membrana, que indica que se ha producido la translocación de la fosfatidilserina, mientras que en ninguno de los dos casos presentan marcaje positivo para IP. Las mismas células observadas en contraste de fase (Fig. 13D y 13H) mostraban unos núcleos equivalentes a los controles, aunque el citoplasma estaba muy vacuolizado.

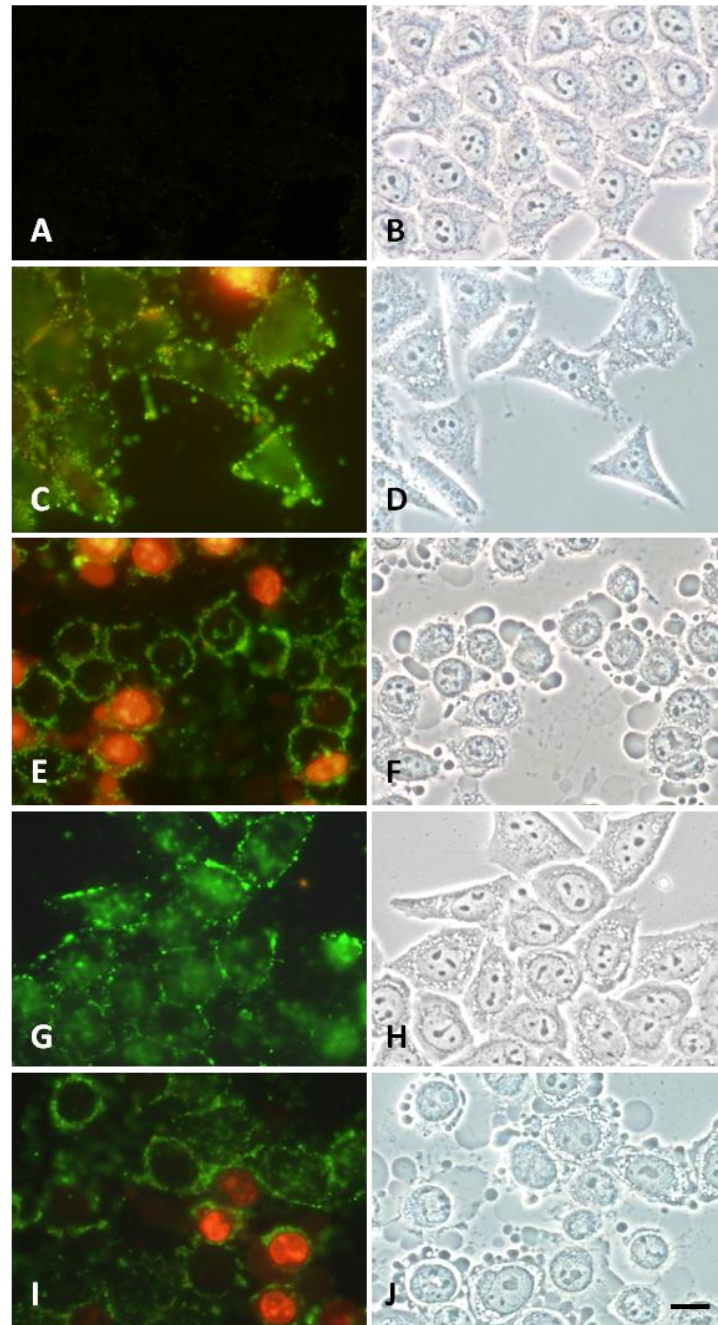


Figura 13. Células HeLa procesadas para el ensayo Annexina V/IP, a distintos tiempos después de los tratamientos fotodinámicos. **A:** células control. **B:** las mismas células observadas en contraste de fase. **C:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-DMSO 1 μ M, irradiadas 15 min y procesadas 30 min después. **D:** las mismas células observadas en contraste de fase. **E:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-DMSO 1 μ M, irradiadas 15 min y procesadas 1 h después. **F:** las mismas células observadas en contraste de fase. **G:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-lip 5 μ M, irradiadas 15 min y procesadas 30 min después. **H:** las mismas células observadas en contraste de fase. **I:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-lip 5 μ M, irradiadas 15 min y procesadas 1 h después. **J:** las mismas células observadas en contraste de fase. Barra de escala 20 μ m.

Una hora después de irradiar, las células seguían siendo positivas para annexina V en ambos casos (Fig. 13E y 13I), aunque algunas células presentaban ya la fluorescencia roja del IP en sus núcleos, debido a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. En contraste de fase (Fig. 13F y 13J), estas células presentaban un citoplasma vacuolizado y numerosas burbujas en la membrana plasmática.

1B.3.4.3. Muerte celular

En las células tratadas con *m*-THPPo-lip 5 μ M durante 24 h, se evaluó el porcentaje de células vivas, necróticas y apoptóticas, a las 6 y 24 h después de la irradiación (Fig. 14). Para ello, se realizaron recuentos de las muestras procesadas para H-33258, AT y ensayo TUNEL. Se realizaron 9 experimentos independientes y al menos 2000 células fueron contadas en cada caso. Seis horas después de los fototratamientos, el 70% de las células están aún vivas, mientras que más del 20% presentan una morfología de tipo apoptótico más o menos avanzada, observándose unos núcleos fragmentados en cuerpos apoptóticos o bien presentando la morfología celular estrellada antes descrita. A las 24 h de finalizar los tratamientos, el número de células muertas es de un 60% aproximadamente, observándose una cantidad de núcleos necróticos ligeramente superior a la de apoptóticos. Estos resultados indican que el mecanismo de muerte es de tipo apoptótico y necrótico.

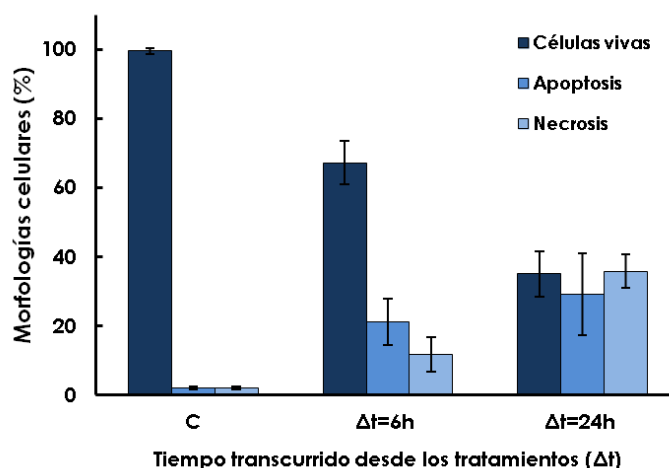


Figura 14. Porcentaje de células vivas, apoptóticas y necróticas a distintos tiempos después de los tratamientos fotodinámicos con *m*-THPPo-lip. Los datos corresponden a la media \pm la desviación estándar (DE) de tres experimentos distintos. Al menos 3000 células fueron contadas en cada caso.

1B.3.4.4. Inmunofluorescencia indirecta para citocromo C

Se estudió la posible translocación del citocromo C mediante inmunofluorescencia indirecta para esta proteína. En la figura 15B observamos que el citocromo C continua localizado en las mitocondrias 1 h después de los tratamientos fotodinámicos con *m*-THPPo-lip, de forma análoga a lo observado en células control (Fig. 15A). Esta situación se mantiene a tiempos posteriores (datos no mostrados). Por el contrario, en células tratadas con *m*-THPPo-DMSO, se puede apreciar que inmediatamente después de irradiar (Fig. 15C), se produce un descenso de la señal del citocromo localizado en las mitocondrias, observándose un marcaje difuso en el citoplasma de la mayor parte de las células (*). Una hora después de los tratamientos fotodinámicos (Fig. 15D), todas las células muestran un marcaje citoplasmático difuso, que confirma la translocación del citocromo C desde las mitocondrias al citoplasma.

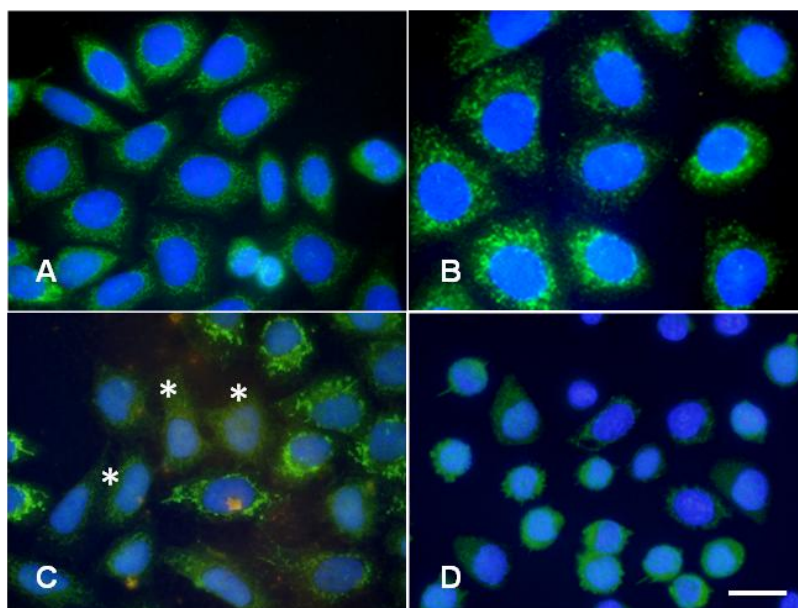


Figura 15. Células HeLa fijadas a distintos tiempos, teñidas por inmunofluorescencia indirecta para citocromo C y contrateñidas con H-33258. **A:** células control. **B:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-lip 5 μ M, irradiadas 15 min y procesadas 1 h después. **C:** células tratadas 24 h con *m*-THPPo-DMSO 1 μ M, irradiadas 15 min y procesadas inmediatamente: la mayoría de las células presentan un marcaje citoplasmático difuso (*). **D:** células incubadas con *m*-THPPo-DMSO 1 μ M durante 24 h, irradiadas 15 min y procesadas 1 h después. Barra de escala: 20 μ m.

1B.3.4.5. Inmunofluorescencia indirecta para caspasa-2 activa

Las células sometidas a tratamientos fotodinámicos con *m*-THPPo-lip, se procesaron para inmunofluorescencia indirecta de caspasa-2 activa. En la figura 16 observamos que 30 min después de irradiar, se ha producido la activación de este enzima observándose una intensa señal roja en posición perinuclear (Fig. 16B), que contrasta con la fluorescencia tenue y difusa que vemos en el citoplasma de las células control (Fig. 16A). Tres horas después de los tratamientos, la señal persiste (Fig. 16C), comenzando a observarse a este tiempo las alteraciones nucleares propias de un proceso apoptótico.

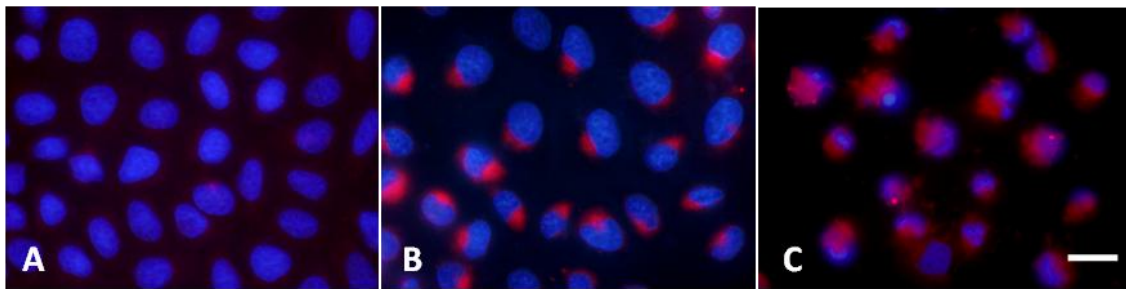


Figura 16. Células HeLa fijadas a distintos tiempos postirradiación, teñidas por inmunofluorescencia indirecta para caspasa-2 activa y contrateñidas con H-33258. **A:** células control. **B:** células incubadas 24 h con *m*-THPPo-lip 5 μ M, irradiadas 15 min y procesadas 30 min después. **C:** células procesadas 3 h después de los tratamientos de 24 h con *m*-THPPo 5 μ M. Barra de escala 20 μ m.

1B.4. Discusión

Como ya se ha comentado en la introducción, los FSs que actualmente están aprobados para su uso clínico tienen una serie de inconvenientes, por lo que el desarrollo de nuevos FSs, más eficaces y que presenten menos efectos secundarios, es uno de los principales objetivos de la TFD.

En este trabajo hemos caracterizado el efecto de un nuevo FS, el *m*-THPPo o temoceno, sobre cultivos de células HeLa. El temoceno es el análogo porfíricénico del *m*-THPC (Foscan®), cuyo uso clínico está aprobado (Morlet y col, 1995; Peng y col, 1995; Banfi y col, 2004; Triesschejin y col, 2005), si bien presenta ciertos problemas asociados a su elevado potencial fotodinámico (Ronn y col, 1996; Pandey, 2000). El *m*-THPPo, además de poseer unas excelentes propiedades fotofísicas, presenta bajo las mismas condiciones experimentales *in vitro*, una toxicidad en ausencia de irradiación significativamente menor que la de su clorina análoga (García-Díaz y col, 2011b), lo que evitaría algunos de los efectos secundarios que presentan los tratamientos con Foscan®. Además su capacidad para la inactivación celular, aunque inferior, es comparable a la producida por el Foscan® (García-Díaz y col, 2011b).

El *m*-THPPo disuelto en DMSO presenta una localización mayoritariamente mitocondrial en células HeLa, tal como confirman las tinciones con Mitotracker Green®. Los tratamientos fotodinámicos con *m*-THPPo-DMSO producen una inactivación celular dependiente de concentración, siendo la apoptosis el mecanismo principal de muerte celular, aunque con concentraciones superiores a 2 μ M también se encuentra una proporción significativa de núcleos necróticos. Durante el proceso apoptótico se observa translocación de la fosfatidilserina inmediatamente después de irradiar, y el ensayo TUNEL es positivo 3 h después de los fototratamientos, lo que confirmaría que la muerte celular se produce en gran medida por un proceso apoptótico.

Sin embargo, como vimos en la introducción, el uso de solventes orgánicos para vehiculizar FS puede conllevar problemas de toxicidad celular y de estabilidad del compuesto, por lo que se desarrolló una formulación liposomal para vehiculizar el *m*-THPPo. Estos liposomas estaban compuestos de una

mezcla de *m*-THPPo/DPPC/DMPG, en una proporción molar de 1:67,5:7,5, y presentaban unas propiedades fotofísicas adecuadas, por lo que se valoró su eficacia en células HeLa.

Los ensayos de supervivencia mostraron que el temoceno incluido en liposomas (*m*-THPPo-lip) presentaba una toxicidad en oscuridad prácticamente nula con cualquiera de las concentraciones testadas. En los estudios de localización subcelular, observamos que era posible detectar el FS en el interior celular con concentraciones superiores a 2 μ M, acumulándose principalmente en el compartimento endo-lisosomal, tal como confirma su colocalización con la sonda LysoTracker®. Después de 15 min de irradiación, las células tratadas 24 h con *m*-THPPo-lip sufren una inactivación celular, dependiente de concentración, por un proceso mayoritariamente apoptótico, caracterizado por la contracción del núcleo y su fragmentación en cuerpos apoptóticos. Dado que la mayor inactivación celular se obtenía con el FS a una concentración 5 μ M, se seleccionó esta condición experimental para los experimentos subsiguientes.

Los ensayos ANV/IP y TUNEL, y las tinciones con H-33258 y con azul de toluidina, realizados en distintos momentos después de los tratamientos, confirmaron que el mecanismo de muerte en este caso era predominantemente apoptótico. Inmediatamente después de la irradiación, las células interfásicas presentan una membrana plasmática íntegra, un citoplasma altamente vacuolizado y un núcleo equivalente al de las células control, aunque las células mitóticas ya muestran fases aberrantes. 30 min después de los tratamientos, aunque el tamaño de las vacuolas se ha incrementado, la morfología de las células interfásicas aún se conserva, mientras el número de fases mitóticas alteradas es mayor. Además, el ensayo ANV/IP revela que a este tiempo ya se ha producido la translocación de fosfatidilserina, lo que se considera un indicador temprano de la apoptosis (Hanshaw y Smith, 2005). A las 3 h de finalizar los tratamientos, es posible detectar formas apoptóticas mediante las tinciones con H-33258 y con AT. También se aprecia un descenso importante del número de fases mitóticas, que muestran en su mayoría una morfología alterada. Los ensayos TUNEL realizados a este tiempo, muestran un resultado positivo en la mayor parte de las células, lo que indica que se está produciendo la

fragmentación de la cromatina, evento asociado también a procesos apoptóticos. Finalmente, 24 h después de los tratamientos la mayoría de las células están muertas, presentando la típica morfología apoptótica, aunque también encontramos núcleos necróticos.

Los recuentos celulares realizados 24 h después de los tratamientos, indican que el 50% de las células que permanecían adheridas a los cubreobjetos, presentaban una morfología de tipo apoptótica y que la letalidad de los tratamientos era del 60%. Este resultado difiere del obtenido en los ensayos de supervivencia realizados por el MTT, en los que se observaba un descenso de la supervivencia del 80%. Esta diferencia se debe a que parte de las células afectadas por los tratamientos fotodinámicos, se despegan del sustrato y son retiradas durante el procesamiento subsiguiente. La mayoría de estas células despegadas son apoptóticas, las cuales pierden la adhesión al sustrato durante las fases iniciales de la muerte, de forma similar a la observada en tratamientos fotodinámicos con otros FSs (Villanueva y col, 1999).

Con el objetivo de determinar si la mitocondria es el orgánulo que desencadena el proceso apoptótico, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia indirecta para citocromo C. La permeabilización selectiva de la membrana mitocondrial externa es un proceso asociado a la apoptosis inducida por diversos estímulos (Ulukaya y col, 2011; Galluzzi y col, 2012).

Bajo nuestras condiciones experimentales, 1 h después de los tratamientos, el citocromo C permanece en el compartimento mitocondrial. Este resultado indica que la mitocondria no ha perdido la integridad de su membrana y que por tanto, no es el orgánulo responsable de iniciar el proceso apoptótico en respuesta a los tratamientos con *m*-THPPo-lip.

Estos resultados contrastan con los obtenidos con el *m*-THPPo disuelto en DMSO. En este caso, inmediatamente después de los tratamientos fotodinámicos se produce la relocalización del citocromo C en gran parte de las células, observándose una señal citoplasmática difusa que impide distinguir la morfología mitocondrial. 1 h después de los tratamientos, la mayoría de las células presentan deslocalización del citocromo C. Por tanto en el este caso el

proceso apoptótico es disparado desde la mitocondria. Como se comento en la introducción, los FS que se acumulan en la mitocondria presentan una respuesta fotodinámica más rápida y eficaz que aquellos que lo hacen en otros orgánulos (Oliveira y col, 2011), lo que explicaría porque los tratamientos con *m*-THPPo-DMSO producen una mayor letalidad que tratamientos análogos con el FS incluido en liposomas.

Por otro lado, la caspasa-2 es un proteasa que cuando se activa puede actuar como iniciadora y/o ejecutora de la apoptosis (Ferri y Kroemer, 2001; Lamkanfi y col, 2002; Boatright y Salvesen, 2003). Aunque el rol de la caspasa-2 ha sido ampliamente estudiado, aún existe gran controversia respecto a su papel en la apoptosis, debido a la dificultad que existe para situarla correctamente en las rutas de señalización apoptóticas (Krumshnabel y col, 2009; Bouchier-Hayes y Green, 2012). La caspasa-2 se localiza en el núcleo, donde actúa como iniciadora en respuesta al daño en el ADN (Machamer, 2003); y en la cara citoplasmática del aparato de Golgi, donde interviene como efectora (Hicks y Machamer, 2002).

Nosotros encontramos que la caspasa-2 se activa inmediatamente después de los tratamientos fotodinámicos con *m*-THPPo-lip, lo que apoya la idea de que en este caso la iniciación de la apoptosis no está mediada por la mitocondria. Las tinciones de inmunofluorescencia indirecta para la forma activa de esta proteasa, muestran una intensa señal en la región perinuclear correspondiente al aparato de Golgi. Aunque el *m*-THPPo-lip se localiza mayoritariamente en orgánulos ácidos, como los lisosomas, estos se encuentran generalmente rodeando el aparato de Golgi. Está ampliamente descrito que en el caso de los FSs que se localizan en los lisosomas, el daño inducido por los tratamientos fotodinámicos puede provocar la disrupción de estos orgánulos, produciéndose la liberación del FS al citoplasma (Norum y col, 2009; Andrzejak y col, 2011b), desde donde se puede relocalizar a otros orgánulos (Alvarez y col, 2011).

Por otra parte, el estrés inducido sobre los lisosomas por los tratamientos fotodinámicos con *m*-THPPo-lip, genera la aparición de numerosas vacuolas citoplasmáticas, las cuales son similares a las descritas como autofagosomas

en otros trabajos (Kessel y Oleinick, 2009; Reiners y col, 2010; Andrzejak y col, 2011a), lo que sugiere que la autofagia podría estar implicada en el proceso de muerte celular, activándose inmediatamente después de la irradiación, bien para contribuir a los proceso de muerte celular o con el fin de que las células sobrevivan al estrés oxidativo generado por los tratamientos fotodinámicos.

1B.5. Conclusiones

Los estudios realizados con este FS en células HeLa, mostraron que el *m*-THPPo-DMSO presenta una localización mayoritariamente mitocondrial, y que es capaz de fotoinactivar los cultivos celulares por un proceso principalmente apoptótico de tipo intrínseco. Además, en ausencia de irradiación, las células tratadas con *m*-THPPo-DMSO, presentan una supervivencia celular muy superior a la observada en células tratadas con *m*-THPC bajo las mismas condiciones experimentales, lo que resulta de gran interés de cara a una posible aplicación *in vivo*.

El *m*-THPPo incluido en liposomas de DPPC y DMPG, presenta una localización preferentemente lisosomal y es capaz de fotoinactivar las células por un proceso apoptótico. La activación de caspasa-2 así como la ausencia de relocalización del citocromo C después de los tratamientos fotodinámicos, indican que en este caso la apoptosis se desencadena por una ruta independiente de las mitocondrias, lo que difiere de los resultados obtenidos con el *m*-THPPo disuelto en DMSO.

Todos estos resultados indican que el *m*-THPPo es un FS prometedor, que presenta unas propiedades fotofísicas adecuadas, una toxicidad en oscuridad muy baja, y que en presencia de luz roja, es capaz de inactivar los cultivos de células HeLa por un proceso fundamentalmente apoptótico. Además, confirman la hipótesis de que variando el sistema de vehiculización de un FS, es posible modificar la localización subcelular de éste, lo que determina la ruta de muerte que se activa en respuesta a los tratamientos fotodinámicos.

Bibliografía

- **Agostinis P**, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J (2011) *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA Cancer J Clin 61:250-281
- **Ahmad N**, Gupta S, Feyes DK, Mukhtar H (2000) *Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells*. J Invest Dermatol 115:1041-1046
- **Alarcón E**, Edwards AM, Garcia AM, Muñoz M, Aspée A, Borsarelli CD, Lissi EA (2009) *Photophysics and photochemistry of zinc phthalocyanine/bovine serum albumin adducts*. Photochem Photobiol Sci 8:255-263
- **Allison RR**, Moghissi K (2013) *Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms*. Clin Endosc 46:24-29.
- **Al-Jamal WT**, Kostarelos K (2007) *Liposome-nanoparticle hybrids for multimodal diagnostic and therapeutic applications*. Nanomedicine (Lond) 2:85-98
- **Alvarez M**, Villanueva A, Acedo P, Cañete M, Stockert JC (2011) *Cell death causes relocation of photosensitizing fluorescent probes*. Acta Histochem 113:363-368
- **Amarante-Mendes GP**, Green DR (1999) *The regulation of apoptotic cell death*. Braz J Med Biol Res 32:1053-1061
- **Amaravadi RK**, Thompson CB (2007) *The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment*. Clin Cancer Res 13:7271-7279
- **Andrzejak M**, Price M, Kessel DH (2011a) *Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells*. Autophagy 7:979-984
- **Andrzejak M**, Santiago M, Kessel D (2011b) *Effects of endosomal photodamage on membrane recycling and endocytosis*. Photochem Photobiol 87:699-706
- **Artus C**, Boujrad H, Bouharrou A, Brunelle MN, Hoos S, Yuste VJ, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, England P, Lorenzo HK, Susin SA (2010) *AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX*. EMBO J 29:1585-1599
- **Asare N**, Låg M, Lagadic-Gossmann D, Rissel M, Schwarze P, Holme JA (2009) *3-Nitrofluoranthene (3-NF) but not 3-aminofluoranthene (3-AF) elicits apoptosis as well as programmed necrosis in Hepa1c1c7 cells*. Toxicology 255:140-150
- **Banfi S**, Caruso E, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, Gariboldi M, Monti E (2004) *Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells*. Bioorg Med Chem 12:4853-4860

- **Bano D**, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L, Rizzuto R, Carafoli E, Nicotera P (2005) *Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity*. Cell 120:275-285
- **Baritaud M**, Boujrad H, Lorenzo HK, Krantic S, Susin SA (2010) *Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis*. Cell Cycle 9:3166-3173
- **Bechet D**, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M (2008) *Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents*. Trends Biotechnol 26:612-621
- **Berg K**, Moan J (1997) *Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer*. Photochem Photobiol 65:403-409
- **Berry DL**, Baehrecke EH (2007) *Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila*. Cell 131:1137-1148
- **Bhuvaneswari R**, Gan YY, Soo KC, Olivo M (2009) *The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis*. Cell Mol Life Sci 66:2275-2283
- **Boatright KM**, Salvesen GS (2003) *Mechanisms of caspase activation*. Curr Opin Cell Biol 15:725-731
- **Bouchier-Hayes L**, Green DR (2012) *Caspase-2: the orphan caspase*. Cell Death Differ 19:51-57
- **Boujrad H**, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA (2007) *AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die*. Cell Cycle 6:2612-2619
- **Brackett CM**, Gollnick SO (2011) *Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity*. Photochem Photobiol Sci 10:649-652
- **Brennan MA**, Cookson BT (2000) *Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis*. Mol Microbiol 38:31-40
- **Buytaert E**, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenheede JR, Heirman I, Grooten J, Agostinis P (2006a) *Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy*. FASEB J 20:756-758
- **Buytaert E**, Callewaert G, Vandenheede JR, Agostinis P (2006b) *Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum*. Autophagy 2:238-240
- **Buytaert E**, Dewaele M, Agostinis P (2007) *Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy*. Biochim Biophys Acta 1776:86-107
- **Candé C**, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, Luban J, Kroemer RT, Giordanetto F, Garrido C, Penninger JM, Kroemer G (2004) *AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis*. Oncogene 23:1514-1521

- **Cañete M**, Villanueva A, Dominguez V, Polo S, Juarranz A, Stockert JC (1998) *Meso-tetraphenylporphyrin: photosensitizing properties and cytotoxic effects on cultured tumor cells*. Int J Oncol 13:497-504
- **Cañete M**, Ortega C, Gavaldá A, Cristobal J, Juarranz A, Nonell S, Teixidó J, Borrell JI, Villanueva A, Rello S, Stockert JC (2004) *Necrotic cell death induced by photodynamic treatment of human lung adenocarcinoma A-549 cells with palladium(II)-tetraphenylporphycene*. Int J Oncol 24:1221-1228
- **Cañete M**, Ortiz A, Juarranz A, Villanueva A, Nonell S, Borrell JI, Teixidó J, Stockert JC (2000) *Photosensitizing properties of palladium-tetraphenylporphycene on cultured tumour cells*. Anticancer Drug Des 15:143-150
- **Cañete M**, Stockert JC, Villanueva A (2009) *Preclinical photodynamic therapy research in Spain. 3. Localization of photosensitizers and mechanisms of cell death in vitro*. J Porphyrins Phthalocyanines 13:544-551
- **Cañete M**, Villanueva A, Juarranz A (1993) *Uptake and photoeffectiveness of two thiazines in HeLa cells*. Anticancer Drug Des 8:471-477
- **Cassidy CM**, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF (2009) *Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice*. J Photochem Photobiol B 95:71-80
- **Castano AP**, Mroz P, Hamblin MR (2006) *Photodynamic therapy and anti-tumour immunity*. Nat Rev Cancer 6:535-545
- **Castedo M**, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004) *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. Oncogene 23:2825-2837
- **Chandra J**, Samali A, Orrenius S (2000) *Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress*. Free Radic Biol Med 29:323-333
- **Chen B**, Roskams T, de Witte PAM (2002) *Antivascular tumor eradication by hypericin-mediated photodynamic therapy*. Photochem Photobiol 76:509-513
- **Cheng Y**, Qiu F, Ye YC, Guo ZM, Tashiro SI, Onodera S, Ikejima T (2009) *Autophagy inhibits reactive oxygen species-mediated apoptosis via activating p38-nuclear factor-kappa B survival pathways in oridonin-treated murine fibrosarcoma L929 cells*. FEBS J 276:1291-1306
- **Chin WWL**, Heng PWS, Thong PSP, Bhuvaneswari R, Hirt W, Kuenzel S, Soo KC, Olivo M (2008) *Improved formulation of photosensitizer chlorin e6 polyvinylpyrrolidone for fluorescence diagnostic imaging and photodynamic therapy of human cancer*. Eur J Pharm Biopharm 69:1083-1093
- **Chipuk JE**, Green DR (2005) *Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?* Nat Rev Mol Cell Biol 6:268-275

- **Chiu SM**, Xue LY, Lam M, Rodriguez ME, Zhang P, Kenney ME, Nieminen AL, Oleinick NL (2010) A requirement for bid for induction of apoptosis by photodynamic therapy with a lysosome- but not a mitochondrion-targeted photosensitizer. *Photochem Photobiol* 86:1161-1173
- **Cho Y**, McQuade T, Zhang H, Zhang J, Chan FKM (2011) RIP1-dependent and independent effects of necrostatin-1 in necrosis and T cell activation. *PLoS One* 6:e23209
- **Cho YS**, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FKM (2009) Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137:1112-1123
- **Christofferson DE**, Yuan J (2010) Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 22:263-268
- **Coupienne I**, Fettweis G, Piette J (2011) RIP3 expression induces a death profile change in U2OS osteosarcoma cells after 5-ALA-PDT. *Lasers Surg Med* 43:557-564
- **Coupienne I**, Fettweis G, Rubio N, Agostinis P, Piette J (2011) 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochem Photobiol Sci* 10:1868-1878
- **Creagh EM**, Conroy H, Martin SJ (2003) Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* 193:10-21
- **Cregan SP**, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 158:507-517
- **Cristóbal J**, Stockert JC, Villanueva A, Rello-Varona S, Juarranz A, Cañete M (2006) Caspase-2: a possible trigger of apoptosis induced in A-549 tumor cells by ZnPc photodynamic treatment. *Int J Oncol* 28:1057-1063
- **Cullen SP**, Brunet M, Martin SJ (2010) Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ* 17:616-623
- **Declercq W**, Berghe TV, Vandenabeele P (2009) RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell* 138:229-232
- **Degterev A**, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1:112-119
- **Dellinger M** (1996) Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol* 64:182-187
- **Denis TGS**, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, Tegos GP (2011) All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence* 2:509-520

- **Denton D**, Nicolson S, Kumar S (2012) *Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts*. Cell Death Differ 19:87-95
- **Derycke ASL**, de Witte PAM (2004) *Liposomes for photodynamic therapy*. Adv Drug Deliv Rev 56:17-30
- **Dolmans DEJGJ**, Fukumura D, Jain RK (2003) *Photodynamic therapy for cancer*. Nat Rev Cancer 3:380-387
- **Dougherty TJ** (1983) *Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors*. Photochem Photobiol 38:377-379
- **Dougherty TJ**, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG (1975) *Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light*. J Natl Cancer Inst 55:115-121
- **Dougherty TJ**, Potter WR, Weishaupt KR (1984) *The structure of the active component of hematoporphyrin derivative*. Prog Clin Biol Res 170:301-314
- **Dysart JS**, Singh G, Patterson MS (2005) *Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells*. Photochem Photobiol 81:196-205
- **Elizalde J**, Vasquez L, Iyo F, Abengoechea S (2012) *Photodynamic therapy in the management of circumscribed choroidal hemangioma*. Can J Ophthalmol 47:16-20
- **Enari M**, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature 391:43-50
- **Fabris C**, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E (2001) *Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. Cancer Res 61:7495-7500
- **Fayter D**, Corbett M, Heirs M, Fox D, Eastwood A (2010) *A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin*. Health Technol Assess 14:1-288
- **Fazi B**, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Sano FD, Piredda L (2008) *Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells*. Autophagy 4:435-441
- **Ferri KF**, Kroemer G (2001) *Organelle-specific initiation of cell death pathways*. Nat Cell Biol 3:E255-E263
- **Fink SL**, Bergsbaken T, Cookson BT (2008) *Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A 105:4312-4317

- **Formigli L**, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ (2000) *Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis*. J Cell Physiol 182:41-49
- **Furre IE**, Møller MTN, Shahzidi S, Nesland JM, Peng Q (2006) *Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells*. Apoptosis 11:2031-2042
- **Galluzzi L**, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, Tavernarakis N, Penninger J, Madeo F, Kroemer G (2008) *No death without life: vital functions of apoptotic effectors*. Cell Death Differ 15:1113-1123
- **Galluzzi L**, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G (2007) *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications*. Cell Death Differ 14:1237-1243
- **Galluzzi L**, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2012) *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ 19:107-120
- **García-Díaz M**, Nonell S, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M, Casadó A, Mora M, Sagristá ML (2011a) *Do folate-receptor targeted liposomal photosensitizers enhance photodynamic therapy selectivity?* Biochim Biophys Acta 1808:1063-1071
- **García-Díaz M**, Sanchez-García D, Soriano J, Sagristà ML, Mora M, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M, Nonell S (2011b) *Temocene: the porphycene analogue of temoporfin (Foscan®)*. Med Chem Commun 7:616-619.
- **Garg AD**, Bose M, Ahmed MI, Bonass WA, Wood SR (2012) *In vitro studies on erythrosine-based photodynamic therapy of malignant and pre-malignant oral epithelial cells*. PLoS One 7:e34475
- **Garg AD**, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P (2010) *Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation*. Biochim Biophys Acta 1805:53-71
- **Gozuacik D**, Kimchi A (2004) *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism*. Oncogene 23:2891-2906
- **Green DR**, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G (2009) *Immunogenic and tolerogenic cell death*. Nat Rev Immunol 9:353-363

- **Hail N**, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M (2006) *Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys*. *Apoptosis* 11:889-904
- **Hansch A**, Frey O, Gajda M, Susanna G, Boettcher J, Bräuer R, Kaiser WA (2008) *Photodynamic treatment as a novel approach in the therapy of arthritic joints*. *Lasers Surg Med* 40:265-272
- **Hanshaw RG**, Smith BD (2005) *New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis*. *Bioorg Med Chem* 13:5035-5042
- **Hatakeyama H**, Akita H, Maruyama K, Suhara T, Harashima H (2004) *Factors governing the in vivo tissue uptake of transferrin-coupled polyethylene glycol liposomes in vivo*. *Int J Pharm* 281:25-33
- **He S**, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X (2009) *Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha*. *Cell* 137:1100-1111
- **Heibein JA**, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, Bleackley RC (2000) *Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax*. *J Exp Med* 192:1391-1402
- **Hengartner MO** (2000) *The biochemistry of apoptosis*. *Nature* 407:770-776
- **Hicks SW**, Machamer CE (2002) *The NH2-terminal domain of Golgin-160 contains both Golgi and nuclear targeting information*. *J Biol Chem* 277:35833-35839
- **Hitomi J**, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J (2008) *Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway*. *Cell* 135:1311-1323
- **Hoi SWH**, Wong HM, Chan JYW, Yue GGL, Tse GMK, Law BKB, Fong WP, Fung KP (2012) *Photodynamic therapy of Pheophorbide a inhibits the proliferation of human breast tumour via both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways in in vitro and in vivo models*. *Phytother Res* 26:734-742
- **Hong SJ**, Dawson TM, Dawson VL (2004) *Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling*. *Trends Pharmacol Sci* 25:259-264
- **Hsieh YJ**, Wu CC, Chang CJ, Yu JS (2003) *Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets*. *J Cell Physiol* 194:363-375
- **Ichikawa K**, Hikita T, Maeda N, Yonezawa S, Takeuchi Y, Asai T, Namba Y, Oku N (2005) *Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels*. *Biochim Biophys Acta* 1669:69-74
- **Issa MCA**, Manela-Azulay M (2010) *Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation*. *An Bras Dermatol* 85:501-511

- **Jänicke RU**, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG (1998) *Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis*. J Biol Chem 273:9357-9360
- **Jin CS**, Zheng G (2011) *Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery*. Lasers Surg Med 43:734-748
- **Johnson DE** (2000) *Noncaspase proteases in apoptosis*. Leukemia 14:1695-1703
- **Juarranz A**, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S (2008) *Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications*. Clin Transl Oncol 10:148-154
- **Kerr JF** (1965) *A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes*. J Pathol Bacteriol 90:419-435
- **Kerr JF**, Gobé GC, Winterford CM, Harmon BV (1995) *Anatomical methods in cell death*. Methods Cell Biol 46:1-27
- **Kerr JF**, Wyllie AH, Currie AR (1972) *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 26:239-257
- **Kessel D**, Castelli M, Reiners JJ (2002) *Apoptotic response to photodynamic therapy versus the Bcl-2 antagonist HA14-1*. Photochem Photobiol 76:314-319
- **Kessel D**, Castelli M, Reiners JJ (2005) *Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species*. Cell Death Differ 12:502-511
- **Kessel D**, Oleinick NL (2009) *Initiation of autophagy by photodynamic therapy*. Methods Enzymol 453:1-16
- **Kessel D**, Vicente MGH, Reiners JJ (2006) *Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy*. Lasers Surg Med 38:482-488
- **Kolhatkar R**, Lote A, Khambati H (2011) *Active tumor targeting of nanomaterials using folic acid, transferrin and integrin receptors*. Curr Drug Discov Technol 8:197-206
- **Kossodo S**, LaMuraglia GM (2001) *Clinical potential of photodynamic therapy in cardiovascular disorders*. Am J Cardiovasc Drugs 1:15-21
- **Krammer B**, Verwanger T (2012) *Molecular response to hypericin-induced photodamage*. Curr Med Chem 19:793-798
- **Kroemer G**, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G, on Cell Death NC (2005) *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death Differ 12 Suppl 2:1463-1467
- **Kroemer G**, Galluzzi L, Brenner C (2007) *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev 87:99-163
- **Kroemer G**, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S,

- Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G, on Cell Death NC (2009) *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ 16:3-11
- **Kroemer G**, Levine B (2008) *Autophagic cell death: the story of a misnomer*. Nat Rev Mol Cell Biol 9:1004-1010
 - **Kroemer G**, Martin SJ (2005) *Caspase-independent cell death*. Nat Med 11:725-730
 - **Krumschnabel G**, Sohm B, Bock F, Manzl C, Villunger A (2009) *The enigma of caspase-2: the laymen's view*. Cell Death Differ 16:195-207
 - **Kumar S** (2007) *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ 14:32-43
 - **Kundu M**, Thompson CB (2008) *Autophagy: basic principles and relevance to disease*. Annu Rev Pathol 3:427-455
 - **Kussovski VK**, Hristov AE, Radoucheva TS (2001) *Proflavine-mediated inactivation of Salmonella dublin exposed to visible sunlight in natural fresh water*. Microbios 105:119-125
 - **Kwon SI**, Cho HJ, Jung JH, Yoshimoto K, Shirasu K, Park OK (2010) *The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in Arabidopsis*. Plant J 64:151-164
 - **Kwon SI**, Cho HJ, Park OK (2010) *Role of Arabidopsis RabG3b and autophagy in tracheary element differentiation*. Autophagy 6:1187-1189
 - **Laane E**, Tamm KP, Buentke E, Ito K, Kharaziha P, Khahariza P, Oscarsson J, Corcoran M, Björklund AC, Hultenby K, Lundin J, Heyman M, Söderhäll S, Mazur J, Porwit A, Pandolfi PP, Zhivotovsky B, Panaretakis T, Grandér D (2009) *Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy*. Cell Death Differ 16:1018-1029
 - **Lamkanfi M**, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P (2002) *Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man*. Cell Death Differ 9:358-361
 - **Launay S**, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C (2005) *Vital functions for lethal caspases*. Oncogene 24:5137-5148
 - **Lee Y**, Baron ED (2011) *Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology*. Semin Cutan Med Surg 30:199-209
 - **Levine B** (2007) *Cell biology: autophagy and cancer*. Nature 446:745-747
 - **Li M**, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA (2001) *An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells*. J Immunol 166:7128-7135
 - **Lin Y**, Choksi S, Shen HM, Yang QF, Hur GM, Kim YS, Tran JH, Nedospasov SA, gang Liu Z (2004) *Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-*

interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. J Biol Chem 279:10822-10828

- **Lipson RL**, Baldes EJ (1960) *The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. Arch Dermatol* 82:508-516
- **Lipson RL**, Baldes EJ, Olsen AM (1961) *The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. J Natl Cancer Inst* 26:1-11
- **Liu B**, Cheng Y, Zhang B, jiao Bian H, ku Bao J (2009) *Polygonatum cyrtonema lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway. Cancer Lett* 275:54-60
- **Lockshin RA**, Williams CM (1965) *Programmed cell death--I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi Silkmoth. J Insect Physiol* 11:123-133
- **Luo Y**, Kessel D (1997) *Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. Photochem Photobiol* 66:479-483
- **Mace PD**, Riedl SJ (2010) *Molecular cell death platforms and assemblies. Curr Opin Cell Biol* 22:828-836
- **Machamer CE** (2003) *Golgi disassembly in apoptosis: cause or effect? Trends Cell Biol* 13:279-281
- **Maduray K**, Karsten A, Odhav B, Nyokong T (2011) *In vitro toxicity testing of zinc tetrasulfophthalocyanines in fibroblast and keratinocyte cells for the treatment of melanoma cancer by photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B* 103:98-104
- **Maduray K**, Odhav B, Nyokong T (2012) *In vitro photodynamic effect of aluminum tetrasulfophthalocyanines on melanoma skin cancer and healthy normal skin cells. Photodiagnosis Photodyn Ther* 9:32-39
- **Mailleux AA**, Overholtzer M, Schmelzle T, Bouillet P, Strasser A, Brugge JS (2007) *BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. Dev Cell* 12:221-234
- **Majno G**, Joris I (1995) *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol* 146:3-15
- **Mancini M**, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, Rosen A (2000) *Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. J Cell Biol* 149:603-612
- **Martin SJ**, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR (1996) *Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. J Biol Chem* 271:28753-28756
- **Martin SJ**, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR (1995) *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a*

general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182:1545-1556

- **Master A**, Livingston M, Gupta AS (2013) *Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: Perspectives and challenges*. *J Control Release* 168:88-102
- **Mathew R**, Karantza-Wadsworth V, White E (2007) *Role of autophagy in cancer*. *Nat Rev Cancer* 7:961-967
- **Mehlen P**, Bredesen DE (2011) *Dependence receptors: from basic research to drug development*. *Sci Signal* 4:mr2
- **Micheau O**, Tschopp J (2003) *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. *Cell* 114:181-190
- **Mihalache CC**, Yousefi S, Conus S, Villiger PM, Schneider EM, Simon HU (2011) *Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events*. *J Immunol* 186:6532-6542
- **Mizushima N**, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. *Nature* 451:1069-1075
- **Moan J**, Berg K (1991) *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen*. *Photochem Photobiol* 53:549-553
- **Moor AC** (2000) *Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy*. *J Photochem Photobiol B* 57:1-13
- **Morlet L**, Vonarx-Coinsmann V, Lenz P, Foultier MT, de Brito LX, Stewart C, Patrice T (1995) *Correlation between meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) biodistribution and photodynamic effects in mice*. *J Photochem Photobiol B* 28:25-32
- **Mouatt-Prigent A**, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC (1996) *Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death?* *Neuroscience* 73:979-987
- **Moubarak RS**, Yuste VJ, Artus C, Bouharrou A, Greer PA, de Murcia JM, Susin SA (2007) *Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis*. *Mol Cell Biol* 27:4844-4862
- **Muehlmann LA**, Joanitti GA, Silva JR, Longo JPF, Azevedo RB (2011) *Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy*. *Braz J Med Biol Res* 44:729-737
- **Nicotera P**, Bernassola F, Melino G (1999) *Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul*. *Cell Death Differ* 6:931-933
- **Nixon RA**, Saito KI, Grynspan F, Griffin WR, Katayama S, Honda T, Mohan PS, Shea TB, Beermann M (1994) *Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease*. *Ann N Y Acad Sci* 747:77-91

- **Noodt BB**, Rodal GH, Wainwright M, Peng Q, Horobin R, Nesland JM, Berg K (1998) *Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells*. *Int J Cancer* 75:941-948
- **Norum OJ**, Selbo PK, Weyergang A, Giercksky KE, Berg K (2009) *Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine*. *J Photochem Photobiol B* 96:83-92
- **Nowis D**, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J (2005) *Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy*. *Acta Biochim Pol* 52:339-352
- **Ochsner M** (1997) *Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours*. *J Photochem Photobiol B* 39:1-18
- **O'Connor AE**, Gallagher WM, Byrne AT (2009) *Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy*. *Photochem Photobiol* 85:1053-1074
- **Oliveira CS**, Turchiello R, Kowaltowski AJ, Indig GL, Baptista MS (2011) *Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency*. *Free Radic Biol Med* 51:824-833
- **Orrenius S**, McCabe MJ, Nicotera P (1992) *Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death*. *Toxicol Lett* 64-65 Spec No:357-364
- **Ortel B**, Shea CR, Calzavara-Pinton P (2009) *Molecular mechanisms of photodynamic therapy*. *Front Biosci* 14:4157-4172
- **Otto W**, Burger M, Fritsche HM, Rössler W, Wieland WF, Denzinger S (2011) *The enlightenment of bladder cancer treatment: origin and progress of photodynamic diagnosis*. *Future Oncol* 7:1057-1066
- **Overholtzer M**, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES, Brugge JS (2007) *A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion*. *Cell* 131:966-979
- **Pandey RK** (2000) *Recent advances in photodynamic therapy*. *J Porphyrins Phthalocyanines* 4:368-373
- **Park JW**, Kirpotin DB, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Papahadjopoulos D, Benz CC (2001) *Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes*. *J Control Release* 74:95-113
- **Pegaz B**, Debeve E, Borle F, Ballini JP, van den Bergh H, Kouakou-Konan YN (2005) *Encapsulation of porphyrins and chlorins in biodegradable nanoparticles: the effect of dye lipophilicity on the extravasation and the photothrombic activity. A comparative study*. *J Photochem Photobiol B* 80:19-27

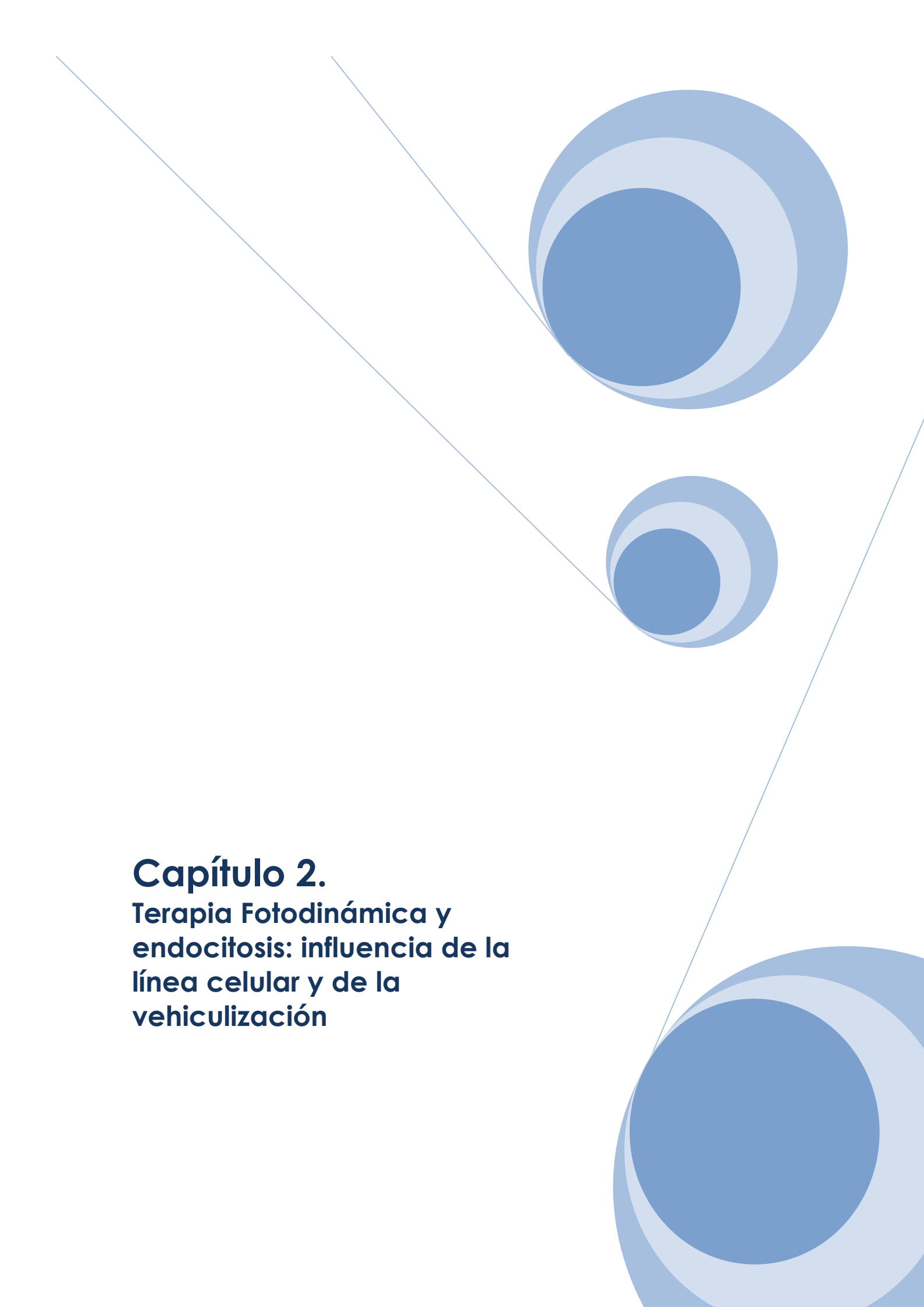
- **Peng Q**, Moan J, Ma LW, Nesland JM (1995) *Uptake, localization, and photodynamic effect of meso-tetra(hydroxyphenyl)porphine and its corresponding chlorin in normal and tumor tissues of mice bearing mammary carcinoma*. Cancer Res 55:2620-2626
- **Peng Q**, Moan J, Nesland JM (1996) *Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy*. Ultrastruct Pathol 20:109-129
- **Pereira WO**, Amarante-Mendes GP (2011) *Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal?* Scand J Immunol 73:401-407
- **Piette J**, Volanti C, Vantieghem A, Matroule JY, Habraken Y, Agostinis P (2003) *Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers*. Biochem Pharmacol 66:1651-1659
- **Poon IKH**, Hulett MD, Parish CR (2010) *Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance*. Cell Death Differ 17:381-397
- **Pop C**, Salvesen GS (2009) *Human caspases: activation, specificity, and regulation*. J Biol Chem 284:21777-21781
- **Qu X**, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B (2007) *Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development*. Cell 128:931-946
- **Rana S**, Gallo A, Srivastava RS, Misra RDK (2007) *On the suitability of nanocrystalline ferrites as a magnetic carrier for drug delivery: functionalization, conjugation and drug release kinetics*. Acta Biomater 3:233-242
- **Reed JC**, Jurgensmeier JM, Matsuyama S (1998) *Bcl-2 family proteins and mitochondria*. Biochim Biophys Acta 1366:127-137
- **Reginato MJ**, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS (2003) *Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis*. Nat Cell Biol 5:733-740
- **Reiners JJ**, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D (2010) *Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy*. Autophagy 6:7-18
- **Reiners JJ**, Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D (2002) *Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage*. Cell Death Differ 9:934-944
- **Rello S**, Stockert JC, Moreno V, Gámez A, Pacheco M, Juarranz A, Cañete M, Villanueva A (2005) *Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments*. Apoptosis 10:201-208
- **Rello-Varona S**, Stockert JC, Cañete M, Acedo P, Villanueva A (2008) *Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn(II)-phthalocyanine*. Int J Oncol 32:1189-1196

- **Remijsen Q**, Berghe TV, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, Rycke RD, Noppen S, Delforge M, Willems J, Vandenabeele P (2011a) *Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation*. Cell Res 21:290-304
- **Remijsen Q**, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Berghe TV (2011b) *Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality*. Cell Death Differ 18:581-588
- **Rodriguez ME**, Zhang P, Azizuddin K, Santos GBD, mao Chiu S, yan Xue L, Berlin JC, Peng X, Wu H, Lam M, Nieminen AL, Kenney ME, Oleinick NL (2009) *Structural factors and mechanisms underlying the improved photodynamic cell killing with silicon phthalocyanine photosensitizers directed to lysosomes versus mitochondria*. Photochem Photobiol 85:1189-1200
- **Ronn AM**, Nouri M, Lofgren LA, Steinberg BM, Westerborn A, Windahl T, Shikowitz MJ, Abramson AL (1996) *Human tissue levels and plasma pharmacokinetics of temorfin (Foscan®, mTHPC)*. Laser Med Sci 11:276-272
- **Sasnauskiene A**, Kadziauskas J, Vezelyte N, Jonusiene V, Kirveliene V (2009a) *Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior*. Apoptosis 14:276-286
- **Sasnauskiene A**, Kadziauskas J, Vezelyte N, Jonusiene V, Kirveliene V (2009b) *Damage targeted to the mitochondrial interior induces autophagy, cell cycle arrest and, only at high doses, apoptosis*. Autophagy 5:743-744
- **Scaffidi C**, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. EMBO J 17:1675-1687
- **Schütze S**, Tchikov V, Schneider-Brachert W (2008) *Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization*. Nat Rev Mol Cell Biol 9:655-662
- **Schweichel JU**, Merker HJ (1973) *The morphology of various types of cell death in prenatal tissues*. Teratology 7:253-266
- **Seitz G**, Fuchs J, Schaefer JF, Warmann SW (2012) *Molecular imaging and photodynamic therapy in hepatoblastoma*. Front Biosci (Elite Ed) 4:487-492
- **Shah GK**, Sang DN, Hughes MS (2009) *Verteporfin combination regimens in the treatment of neovascular age-related macular degeneration*. Retina 29:133-148
- **Sharif-Askari E**, Alam A, Rhéaume E, Beresford PJ, Scotto C, Sharma K, Lee D, DeWolf WE, Nuttall ME, Lieberman J, Sékaly RP (2001) *Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation*. EMBO J 20:3101-3113
- **Shen HM**, Codogno P (2011) *Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species?* Autophagy 7:457-465

- **Shen S**, Kepp O, Michaud M, Martins I, Minoux H, Métivier D, Maiuri MC, Kroemer RT, Kroemer G (2011) *Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study*. *Oncogene* 30:4544-4556
- **Silva JN**, Filipe P, Morlière P, Mazière JC, Freitas JP, Gomes MM, Santus R (2008) *Photodynamic therapy: Dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic*. *Biomed Mater Eng* 18:319-327
- **Sofou S**, Sgouros G (2008) *Antibody-targeted liposomes in cancer therapy and imaging*. *Expert Opin Drug Deliv* 5:189-204
- **Soriano J**, García-Díaz M, Mora M, Sagristá ML, Nonell S, Villanueva A, Stockert JC, Canete M (2013) *Liposomal temocene (m-THPPo) photodynamic treatment induces cell death by mitochondria-independent apoptosis*. *Biochim Biophys Acta* DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.05.021.
- **Strasser A**, Cory S, Adams JM (2011) *Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases*. *EMBO J* 30:3667-3683
- **Takano J**, Tomioka M, Tsubuki S, Higuchi M, Iwata N, Itohara S, Maki M, Saido TC (2005) *Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice*. *J Biol Chem* 280:16175-16184
- **Teitz T**, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ (2000) *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN*. *Nat Med* 6:529-535
- **Thorburn A** (2008) *Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes*. *Apoptosis* 13:1-9
- **Torchilin VP** (2010) *Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example*. *Handb Exp Pharmacol*:3-53
- **Triesscheijn M**, Ruevekamp M, Aalders M, Baas P, Stewart FA (2005) *Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response*. *Photochem Photobiol* 81:1161-1167
- **Ulukaya E**, Acilan C, Yilmaz Y (2011) *Apoptosis: why and how does it occur in biology?* *Cell Biochem Funct* 29:468-480
- **Usuda J**, mao Chiu S, Azizuddin K, yan Xue L, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL (2002) *Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: dependence on Bax*. *Photochem Photobiol* 76:217-223
- **Uzdensky A**, Kolpakova E, Juzeniene A, Juzenas P, Moan J (2005) *The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells*. *Biochim Biophys Acta* 1722:43-50
- **Vakifahmetoglu H**, Olsson M, Zhivotovsky B (2008) *Death through a tragedy: mitotic catastrophe*. *Cell Death Differ* 15:1153-1162

- **van Dongen GAMS**, Visser GWM, Vrouwenraets MB (2004) *Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer*. *Adv Drug Deliv Rev* 56:31-52
- **Vandenabeele P**, Galluzzi L, Berghe TV, Kroemer G (2010) *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:700-714
- **Vanlangenakker N**, Berghe TV, Vandenabeele P (2012) *Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview*. *Cell Death Differ* 19:75-86
- **Vargas A**, Pegaz B, Debeffe E, Konan-Kouakou Y, Lange N, Ballini JP, van den Bergh H, Gurny R, Delie F (2004) *Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos*. *Int J Pharm* 286:131-145
- **Villanueva A** (1993) *The cationic meso-substituted porphyrins: an interesting group of photosensitizers*. *J Photochem Photobiol B* 18:295-296
- **Villanueva A**, Domínguez V, Polo S, Vendrell VD, Sanz C, Cañete TM, Juarranz A, Stockert JC (1999) *Photokilling mechanisms induced by zinc(II)-phthalocyanine on cultured tumor cells*. *Oncol Res* 11:447-453
- **Villanueva A**, Vidania R, Stockert JC, Cañete M, Juarranz A. *Photodynamic effects on cultured tumor cells (2003) Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms*. In: Nalwa HS, editor. *Handbook of Photochemistry and Biology*. Vol 4. California: American Scientific Publishers. p. 79-117.
- **Vittar NBR**, Awruch J, Azizuddin K, Rivarola V (2010) *Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine*. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1123-1131
- **Wajant H** (2002) *The Fas signaling pathway: more than a paradigm*. *Science* 296:1635-1636
- **Waksman R**, McEwan PE, Moore TI, Pakala R, Kolodgie FD, Hellinga DG, Seabron RC, Rychnovsky SJ, Vasek J, Scott RW, Virmani R (2008) *PhotoPoint photodynamic therapy promotes stabilization of atherosclerotic plaques and inhibits plaque progression*. *J Am Coll Cardiol* 52:1024-1032
- **Wang X**, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D (2002) *Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in Caenorhabditis elegans*. *Science* 298:1587-1592
- **Wang Y**, Dawson VL, Dawson TM (2009) *Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos*. *Exp Neurol* 218:193-202
- **Wilson NS**, Dixit V, Ashkenazi A (2009) *Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks*. *Nat Immunol* 10:348-355
- **Wlodkowic D**, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z (2011) *Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death*. *Methods Cell Biol* 103:55-98
- **Wyld L**, Reed MW, Brown NJ (2001) *Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type*. *Br J Cancer* 84:1384-1386

- **yan Xue L**, mao Chiu S, Azizuddin K, Joseph S, Oleinick NL (2007) *The death of human cancer cells following photodynamic therapy: apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy*. Photochem Photobiol 83:1016-1023
- **yan Xue L**, mao Chiu S, Fiebig A, Andrews DW, Oleinick NL (2003) *Photodamage to multiple Bcl-xL isoforms by photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4*. Oncogene 22:9197-9204
- **Yang Z**, Klionsky DJ (2010) *Eaten alive: a history of macroautophagy*. Nat Cell Biol 12:814-822
- **Yao J**, Zhang GJ (1996) *Loss of lysosomal integrity caused by the decrease of proton translocation in methylene blue-mediated photosensitization*. Biochim Biophys Acta 1284:35-40
- **Yoo JO**, Lim YC, Kim YM, Ha KS (2011) *Differential cytotoxic responses to low- and high-dose photodynamic therapy in human gastric and bladder cancer cells*. J Cell Biochem 112:3061-3071
- **Yoshida T**, Shimizu A, Masuda Y, Mii A, Fujita E, Yoshizaki K, Higo S, Kanzaki G, Kajimoto Y, Takano H, Fukuda Y (2012) *Caspase-3-independent internucleosomal DNA fragmentation in ischemic acute kidney injury*. Nephron Exp Nephrol 120:e103-e113
- **Yu L**, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ (2004) *Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8*. Science 304:1500-1502
- **Zhang DW**, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J (2009) *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. Science 325:332-336
- **Zong WX**, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB (2004) *Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death*. Genes Dev 18:1272-1282

An abstract graphic featuring three blue circles of varying sizes. The top circle is the largest, the middle one is the smallest, and the bottom one is medium-sized. They are arranged along a diagonal line that runs from the top left towards the bottom right. The circles have a layered, concentric appearance with different shades of blue. The background is white.

Capítulo 2.

**Terapia Fotodinámica y
endocitosis: influencia de la
línea celular y de la
vehiculización**

INTRODUCCIÓN

1. Endocitosis

La membrana plasmática es una estructura presente en todas las células, que forma una fina barrera hidrofóbica, delimitando el contenido celular. Dicha membrana está formada por una bicapa lipídica, compuesta fundamentalmente por fosfolípidos, colesterol y proteínas asociadas, pero la composición de la membrana plasmática no es estática, sino que está en continua remodelación en respuesta a señales extra e intracelulares (Traub y col, 2009).

Aunque su principal función es aislar el interior celular del medio externo, la membrana plasmática necesita permitir el intercambio de sustancias con el medio extracelular, por lo que presenta una permeabilidad selectiva, que permite el paso de pequeñas moléculas no polares y con carga neutra, tales como el agua, la urea, el O_2 o el CO_2 . El proceso por el que entran estas moléculas se conoce como difusión simple, no requiere de gasto energético y se realiza a favor de gradiente de concentración o electroquímico (Sugano y col, 2010).

Sin embargo, son pocas las moléculas capaces de difundir a través de la membrana, por lo que en la mayor parte de los casos es necesaria la intervención de proteínas de membrana, que se conocen como proteínas de transporte, y que permiten el paso de moléculas cargadas (como iones), polares o de mayor tamaño (glucosa). Si las moléculas penetran a favor de gradiente electroquímico, el proceso se conoce como difusión facilitada y no requiere gasto energético. Por el contrario, si el transporte tiene lugar en contra de gradiente, es necesario el consumo de energía para que tenga lugar este proceso, que se denomina transporte activo. Es el caso de las bombas Na^+-K^+ (Consortium y col, 2010). A diferencia de la difusión pasiva, ambos mecanismos se saturan cuando la cantidad de solutos supera el número de proteínas transportadoras (Sugano y col, 2010).

Finalmente, en el caso de macromoléculas y otros compuestos de gran tamaño, la célula ha desarrollado una serie de mecanismos más selectivos, que se conocen en conjunto como endocitosis.

1.1. ¿Qué es la endocitosis?

El concepto de endocitosis se remonta a finales del siglo XIX, cuando Metchnikoff observó que en las células que internalizan partículas de tornasol, este compuesto varía su color de azul a rojo, lo que indica que dichas partículas se acumulan en un compartimento ácido de la célula. Más tarde, en 1931, Lewis fotografió distintos tipos celulares incorporando fluido extracelular dentro de vesículas, denominando a esta vía de internalización pinocitosis (Lewis, 1931). Desde entonces, el mecanismo por el que las células de mamífero son capaces de incorporar distintas moléculas ha sido objeto de debate, encontrándose en los últimos años gran cantidad de trabajos que abordan el estudio de las rutas endocíticas.

Actualmente la endocitosis se define como el proceso por el que las células son capaces de incorporar en su interior moléculas de distintos tamaños, que engloban en una invaginación de su membrana plasmática, que acaba desprendiéndose de la misma, quedando las moléculas contenidas en el interior de una vesícula en el citoplasma (Bareford y col, 2007). Esta vesícula sigue distintas rutas una vez dentro de la célula dependiendo del mecanismo endocítico, pudiendo dirigirse bien hacia la ruta degradativa de los lisosomas, o bien puede evitarla y dirigirse al aparato de Golgi, al retículo endoplasmático e incluso al núcleo (Fig. 1). Esto hace que a la hora de desarrollar un nuevo fármaco sea importante conocer su ruta de internalización. Por ejemplo, en el caso de enfermedades asociadas a los lisosomas o para el tratamiento del Alzheimer, es conveniente que los compuestos sigan la ruta degradativa (Bareford y col, 2007), mientras que aquellos compuestos sensibles a la degradación por las enzimas hidrolíticas de los lisosomas, requieren evitar dicha ruta (Jones, 2008).

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la endocitosis no se limita únicamente a la internalización de macromoléculas, sino que también interviene en la regulación de diversos procesos celulares tan dispares como la

mitosis, la presentación de antígenos, la migración celular o la regulación de diversas cascadas de señalización. Además, numerosos patógenos utilizan distintas rutas endocíticas para penetrar en las células (Doherty y McMahon, 2009).

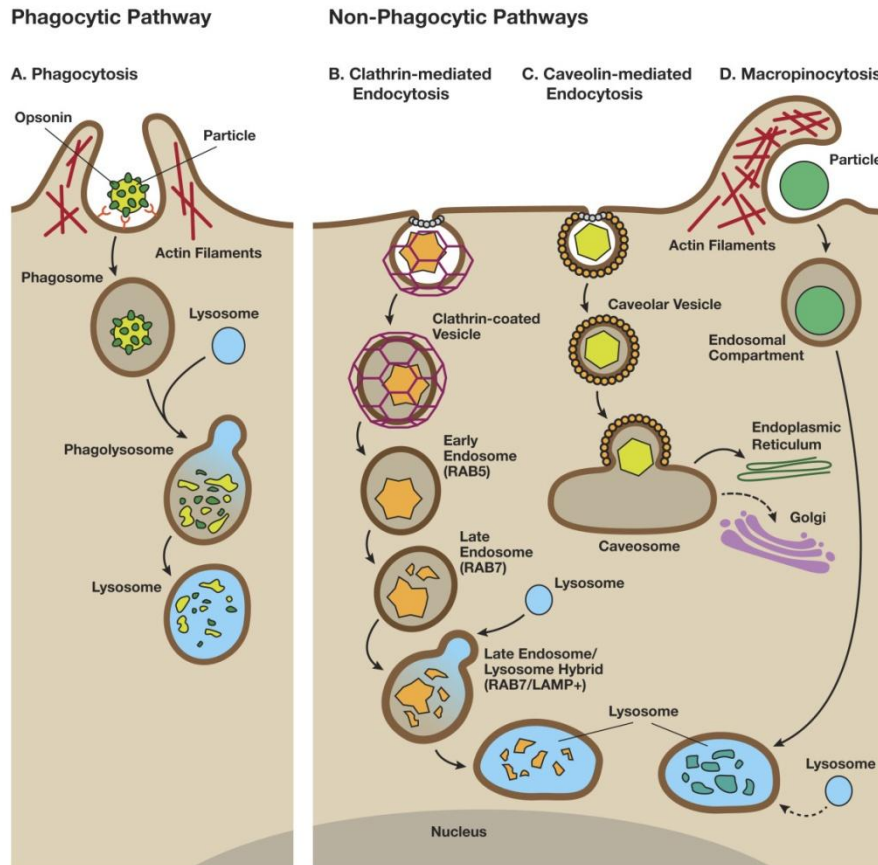


Figura 1. Esquema de las rutas intracelulares de los principales mecanismos endocíticos (Hillaireau y Couvreur, 2009. Cell Mol Life Sci 66:2873-2896)

1.2. Mecanismos de endocitosis

La endocitosis comprende dos tipos de mecanismos diferentes, fagocitosis y pinocitosis.

- **Fagocitosis:** está implicada en la internalización de grandes partículas (más de 200 nm), así como de bacterias y otros microorganismos. Normalmente está restringida a tipos celulares especializados, pertenecientes al denominado sistema retículo endotelial (REL), como son los macrófagos y los neutrófilos.

- **Pinocitosis:** ocurre en todos los tipos celulares y está implicada en la entrada de fluidos y solutos en la célula. Dentro de esta vía existen distintas variantes, que se pueden dividir en dos categorías, independientes de receptor: macropinocitosis; y dependientes de receptor: endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolinas o endocitosis independiente de ambas (Fig.2).

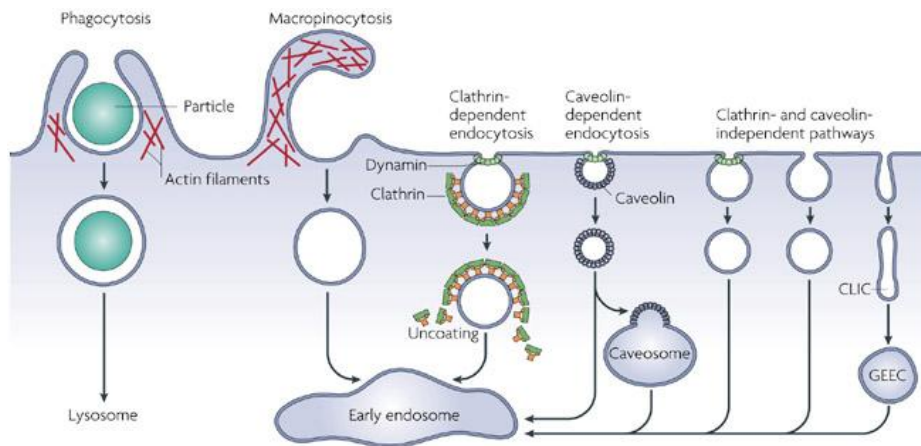


Figura 2. Principales mecanismos endocíticos (Parton y Simons, 2007. Nat Rev Mol Cell Biol 8:185-194)

1.2.1. Macropinocitosis

Observada por primera vez en 1931 por Lewis (Lewis, 1931), se considera uno de los mecanismos de endocitosis más arcaicos. En este proceso no se produce una interacción entre receptores de membrana y las moléculas que son endocitadas (Kirkham y Parton, 2005; Kerr y Teasdale, 2009; Lim y Gleeson, 2011), sino que es la activación de receptores tirosina-kinasa, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), lo que provoca la polimerización de los microfilamentos de actina en el interior celular, que originan una evaginación (*ruffle*) que crece paralela a la membrana plasmática, cerrándose sobre ésta y formando una vesícula llamada macropinosoma (Khalil y col, 2006; Doherty y McMahon, 2009; Kerr y Teasdale, 2009; Lim y Gleeson, 2011). En este caso, el proceso por el que la evaginación se fusiona con la membrana no es aún bien conocido. El macropinosoma tiene un tamaño superior a 0,2 μm (Kerr y Teasdale, 2009), llegando en algunos casos a superar los 5 μm de tamaño (Arsianti y col, 2010).

En cuanto al destino final del macropinosoma, no existe consenso. Aunque la mayoría de autores coinciden en que bajo determinadas condiciones, puede expulsar su contenido de nuevo al exterior celular, en un proceso conocido como transcitosis (Amyere y col, 2002; Lühmann y col, 2008), en la mayoría de los casos el macropinosoma acaba fusionándose con los lisosomas (Amyere y col, 2002; Perret y col, 2005; Lühmann y col, 2008), aunque otros estudios apuntan a que escapa de la ruta ácida, acumulándose en endosomas tardíos con un pH ligeramente ácido, pero sin llegar a fusionarse con los lisosomas (Wadia y col, 2004; Arsianti y col, 2010). Esta variación en la ruta intracelular parece estar relacionada con la línea celular y con el rol que desempeña la macropinocitosis en estas células. En el sistema inmunológico y en el riñón, la macropinocitosis tiene como función la degradación de los compuestos internalizados, mientras que en otros tipos celulares puede actuar reorganizando la membrana plasmática (Hewlett y col, 1994; Schnatwinkel y col, 2004; Donaldson y col, 2009).

1.2.2. Endocitosis mediada por clatrina

Desde que se describieron los aspectos básicos de la formación de las depresiones de clatrina (Roth y Porter, 1964), la endocitosis mediada por clatrina ha sido uno de los mecanismos endocíticos más estudiados. Es un mecanismo endocítico mediado por receptor, llevado a cabo por todas las células eucariotas y en el que intervienen gran variedad de proteínas de membrana, que interaccionan con distintas macromoléculas formando un complejo de internalización específico. Se trata de una ruta muy versátil, ya que gran variedad de moléculas pueden internalizarse por esta vía, gracias a la diversidad de proteínas adaptadoras que intervienen en este proceso.

Este tipo de endocitosis tiene lugar en unas regiones de la membrana, conocidas como depresiones de clatrina y consta de cinco etapas (Fig. 3) (McMahon y Boucrot, 2011):

- **Nucleación:** consiste en la formación de las depresiones de clatrina. Comienza con el reclutamiento de la proteína adaptadora 2 (AP2), desde el citoplasma hacia la membrana plasmática, aunque recientes estudios apuntan a que la iniciación del proceso esta mediada por un módulo de

nucleación, compuesto por distintas proteínas, que intervienen iniciando la curvatura de la membrana que da lugar a la depresión (Stimpson y col, 2009; Henne y col, 2010).

- **Selección de la carga:** AP2, junto con otras proteínas adaptadoras, media la selección de la carga. AP2 se une a los receptores de membrana tanto directamente, como indirectamente a través de proteínas adaptadoras (Keyel y col, 2006; Schmid y col, 2006; Mettlen y col, 2010; McMahon y Boucrot, 2011). Estas proteínas adaptadoras pueden expresarse solo en determinados tipos celulares, confiriendo propiedades específicas al tejido (Keyel y col, 2006; Mettlen y col, 2010). Además de conferir especificidad, la gran diversidad de proteínas adaptadoras evita la saturación de este mecanismo endocítico (Warren y col, 1997; 1998; McMahon y Boucrot, 2011).
- **Ensamblaje de la cubierta de clatrina:** una vez unida la carga a AP2, se produce el reclutamiento de la clatrina desde el citoplasma a la membrana plasmática. La clatrina es una proteína constituida por tres cadenas pesadas, muy conservadas en todos los eucariotas, que proveen sujeción y tres cadenas ligeras que regulan su unión y desunión (Doherty y McMahon, 2009). AP2 y otras proteínas adaptadoras accesorias pueden reclutar la clatrina, que contribuye a estabilizar la curvatura de la invaginación (Saffarian y col, 2009).
- **Escisión de la vesícula:** una vez la vesícula endocítica se cierra, se produce su escisión, para lo cual es necesaria la dinamina (Hinshaw y Schmid, 1995; Sweitzer y Hinshaw, 1998; Ferguson y Camilli, 2012). La dinamina polimeriza formando un anillo contráctil sobre el cuello de la vesícula y mediante la hidrólisis de GTP produce la escisión de ésta (modelo mecano-químico) (Danino y col, 2004). Otros autores proponen un modelo regulativo en el que la dinamina recluta a otros efectores, que son los que llevan a cabo la estrangulación. También existe un modelo que combina ambas hipótesis (Nankoe y Sever, 2006). En esta fase también puede intervenir la actina, ayudando a la formación de la vesícula durante la internalización de moléculas de gran tamaño, virus y bacterias, que requieren que se genere

una mayor curvatura en la membrana para dar lugar a la invaginación (Veiga y col, 2007; Cureton y col, 2009). Sin embargo, la intervención de la actina no es imprescindible en células de mamíferos, aunque puede influir en el tráfico intracelular de las vesículas (Fujimoto y col, 2000; Boucrot y col, 2006). En levaduras la actina sí juega un papel imprescindible, dada la mayor rigidez de su pared celular (Kaksonen y col, 2005; Aghamohammadzadeh y Ayscough, 2009).

- **Desensamblaje y reciclado de la clatrina:** tras liberarse la vesícula en el citoplasma, la cubierta de clatrina se desensambla por la acción de la ATPasa HSC70 y su cofactor, la auxilina (Schlossman y col, 1984; Ungewickell y col, 1995; Rothnie y col, 2011), tras lo que la vesícula desnuda se dirige hacia los endosomas tempranos, siguiendo la ruta de maduración en vesículas de pH cada vez más ácido, hasta acabar fundiéndose con lisosomas, con lo que el interior de la vesícula alcanza un pH de 5. Durante ese proceso los receptores se reciclan a la membrana plasmática, o bien continúan hacia los lisosomas para su degradación (Bareford y col, 2007; Lühmann y col, 2008; Arsianti y col, 2010). La clatrina una vez libre en el citoplasma es reutilizada para la formación de una nueva vesícula.

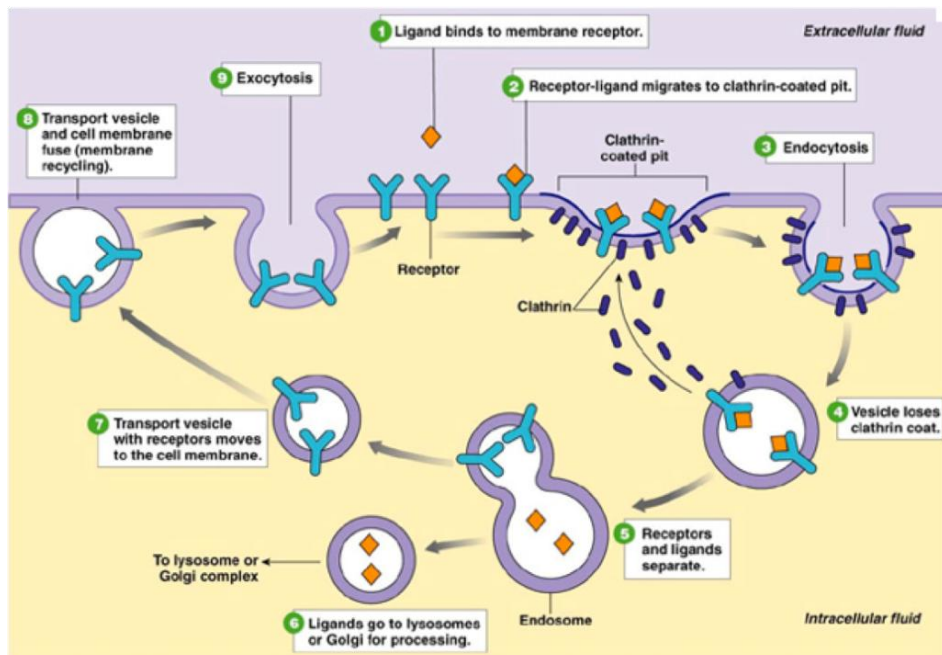


Figura 3. Esquema de la endocitosis mediada por clatrina. (http://wiki.geneontology.org/index.php/Signaling_and_receptor-mediated_endocytosis)

El tamaño de las vesículas cubiertas de clatrina es variable en los distintos organismos, siendo mucho menores en plantas y levaduras que en animales, dado que la rigidez de su pared celular dificulta la formación de vesículas de mayor tamaño (de Rooij y col, 2010). También varía entre tipos celulares: en células neuronales de ratón oscila entre 70-90 nm (Cheng y col, 2007), mientras que en células epiteliales se sitúan entre 120-150 nm (Bretscher y col, 1980; McMahon y Boucrot, 2011). En cualquier caso, el límite superior de tamaño nunca supera los 200 nm (Ehrlich y col, 2004).

La endocitosis mediada por clatrina está implicada en diversas funciones celulares:

- **Internalización de los receptores de diversos metabolitos** como el colesterol o el hierro (Anderson y col, 1977, Pearse, 1982). Dicha internalización puede ser constitutiva, de modo que el receptor se internaliza independientemente de que se produzca la unión receptor-ligando. Es el caso del receptor de la transferrina (TfR) (Motley y col, 2003; Mettlen y col, 2010) o de los LDLR (Anderson y col, 1977; Mettlen y col, 2010). La internalización del receptor también puede ser inducida por la unión de un ligando al receptor, es decir, solo se produce cuando se unen receptor y ligando, internalizándose ambos (Keyel y col, 2006; Lan y col, 2011).
- **Regulación de la transducción de señales.** Alterando la composición proteica de la membrana plasmática, la endocitosis mediada por clatrina es capaz de modular la transducción de señales, afectando a procesos celulares tan variados como el crecimiento y división celular, la quimiotaxis, la transmisión sináptica o la respuesta inmune (Sorkin y von Zastrow, 2009; Scita y Fiore, 2010; Haucke y col, 2011). Generalmente, la forma en que la endocitosis mediada por clatrina regula estas señales es poniendo fin a las mismas, para lo que los receptores de la membrana no se reciclan, sino que se degradan en los lisosomas, lo que implica el final de la señal (Yu y col, 2007).
- **Reciclado de vesículas sinápticas.** La endocitosis mediada por clatrina tiene un papel fundamental en la regulación del tamaño (Nonet y col, 1999; McMahon y Boucrot, 2011) y la composición de las vesículas

sinápticas (Dittman y Kaplan, 2006; Takamori y col, 2006), así como el reciclado de éstas (Heuser y Reese, 1973; McMahon y Boucrot, 2011).

- **Entrada de virus, bacterias y toxinas.** Pese a no ser una función propiamente dicha, numerosos patógenos utilizan esta vía endocítica para penetrar en las células. Las toxinas, por su pequeño tamaño son capaces de entrar con facilidad por este mecanismo (Haucke y Camilli, 1999; Dong y col, 2003; Peng y col, 2012). En cuanto a los virus, aquellos de pequeño tamaño, como el rinovirus, pueden penetrar por esta vía fácilmente, mientras que los de mayor tamaño, necesitan de la formación de vesículas mayores (virus de la gripe A) o la alteración de la geometría normal de las vesículas de clatrina (virus de la somatitis vesicular) (Ehrlich y col, 2004; Rust y col, 2004; Cureton y col, 2009). Finalmente, las bacterias y hongos pueden utilizar mecanismos de internalización, en los que la clatrina interviene de una forma distinta a la clásica y en los que el citoesqueleto de actina sí parece necesario (Veiga y col, 2007; Eto y col, 2008; Moreno-Ruiz y col, 2009).

1.2.3. Endocitosis mediada por caveolina

Se trata de otro mecanismo de endocitosis mediado por receptor, asociado a la presencia de caveolas. Fueron identificadas por primera vez durante los años 50 (Palade, 1953) y se trata de pequeños microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos (Doherty y McMahon, 2009; Lajoie y Nabi, 2010; Parton y del Pozo, 2013). Clásicamente se han descrito como invaginaciones de la membrana con forma de botella, pero la morfología es variable y también pueden ser planas, tubulares en forma de cesta, o asociarse formando racimos (Pelkmans y col, 2001; Harris y col, 2002). Este tipo de invaginación existe en muchos tipos de célula de mamífero, tienen alrededor de 60-80 nm de diámetro y constituyen aproximadamente un tercio de la membrana plasmática, siendo especialmente abundantes en músculo liso, neumocitos tipo I, fibroblastos y células endoteliales (Parton y col, 2006). Se trata de un mecanismo de internalización más lento que la endocitosis mediada por clatrina (Nichols, 2003).

La formación de estas invaginaciones está inducida por la caveolina 1 (cav-1) (Rothberg y col, 1992; Parton y del Pozo, 2013). Tradicionalmente se ha considerado que la sola expresión de esta proteína en células carentes de caveolas, como es el caso de los linfocitos, es capaz de inducir su formación (Fra y col, 1995). Además de la cav-1, las células de mamífero también presentan dos isoformas de ésta: la cav-2 y la cav-3, siendo esta última específica de tejido muscular (Galbiati y col, 2000; Parton y del Pozo, 2013). Mientras que las cav-1 y -3 se localizan en la membrana plasmática, la cav-2 se encuentra en el aparato de Golgi y únicamente se dirige hacia la membrana al unirse con cav-1 en ese orgánulo, formando heteroligómeros (Breuza y col, 2002). En los tres casos se trata de proteínas integrales de membrana que forman una horquilla en la bicapa lipídica, cuyos dos extremos quedan expuestos hacia el citoplasma, diferenciándose únicamente en la secuencia de aminoácidos que las constituyen (Williams y Lisanti, 2004).

Todas las caveolinas se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso, desde donde se exportan hacia el aparato de Golgi (Hayer y col, 2010). Una vez en este orgánulo, sufren una serie de modificaciones (Dietzen y col, 1995), tras las que pasan por un proceso de oligomerización e interaccionan con distintos lípidos, entre ellos el colesterol (Pol y col, 2005), para formar la caveola (Tagawa y col, 2005), que se exporta desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática (Fig. 4).

La formación de las caveolas requiere de la oligomerización de cav-1, para lo cual se asocian entre 14-16 moléculas de cav-1 (Parton y col, 2006). La cav-2 interviene también en la biogénesis de las caveolas, teniendo un papel modulador en el proceso, aunque no resulta imprescindible para su formación (Sowa y col, 2003). Las cav-1 y -2 se asocian formando heteroligómeros, dando lugar a un armazón que mantiene la estructura de la caveola (Parton y col, 2006; Hayer y col, 2010).

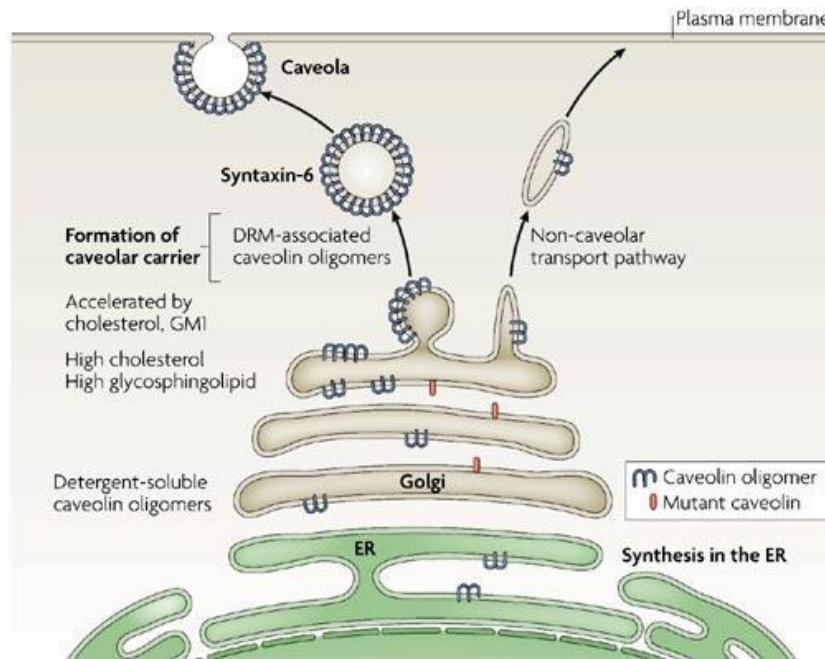


Figura 4. Esquema del proceso de maduración de las caveolas (Parton y Simons , 2007. Nat Rev Mol Cell Biol 8:185-194)

Recientes estudios han puesto de manifiesto la intervención de la familia de las cavinas en el proceso de formación de las caveolas (Briand y col, 2011). Esta familia proteica está compuesta por cuatro miembros, que están implicados en la biogénesis de las caveolas y tienen funciones relacionadas con el soporte, la inducción de la curvatura de las caveolas y la regulación de esta vía endocítica (McMahon y col, 2009). Su intervención resulta necesaria para la formación de las caveolas, lo que contradice la idea clásica de que la sola presencia de cav-1 es suficiente para la formación de las mismas (Hill y col, 2008; Liu y Pilch, 2008).

Normalmente las caveolas presentan un comportamiento estático (Thomsen y col, 2002; Doherty y McMahon, 2009), lo que sugiere que no intervienen en la internalización constitutiva de moléculas. Sin embargo, ante la presencia del ligando correcto, se produce una activación de tirosina-quinasas de la familia Src, que fosforilan los residuos de tirosina de la cav-1, iniciándose así una cascada de señales que resulta en la internalización del ligando (Aoki y col, 1999; Pelkmans y col, 2001; Parton and Richards, 2003; Damm y col, 2005). En este proceso es necesaria la intervención de la dinamina II, para producir la escisión de la vesícula endocítica (Henley y col, 1998; 1999; Kumari y col, 2010).

El colesterol también juega un papel destacado en esta vía endocítica, regulando la expresión de cav-1, así como la dinámica y formación de caveolas. Se ha observado que el incremento de los niveles de colesterol en la célula estimula la endocitosis mediada por caveolina (Sharma y col, 2004), mientras la depleción de colesterol puede inhibir esta ruta endocítica. El colesterol interacciona directamente con la cav-1 (Fielding y col, 2002), estando los niveles de ambas moléculas íntimamente relacionados, de modo que células que no expresan cav-1 presentan niveles más bajos de colesterol que aquellas que si la expresan (Breuza y col, 2002). Además de su papel en la endocitosis mediada por caveolina, diversos estudios apuntan a que la cav-1 puede tener un papel regulador negativo sobre la endocitosis mediada por balsas lipídicas (Nabi y Le, 2003; Lajoie y Nabi, 2007).

Otro elemento importante en la endocitosis mediada por caveolina es la actina (Doherty y McMahon, 2009; Parton y del Pozo, 2013). La cav-1 interacciona con los filamentos de actina a través de su extremo N-terminal (Stahlhut y van Deurs, 2000), manteniendo de esta forma las caveolas estáticas en la membrana. La despolimerización de la actina con latrunculina A, provoca la acumulación de estructuras positivas para cav-1 en la región centrosomal de la célula, mientras que el tratamiento con citocalasina D, inhibe la internalización mediada por caveolina de moléculas como la fosfatasa alcalina (Parton y col, 1994) o el complejo antígeno-BCR (Caballero y col, 2006).

Al internalizarse las caveolas, forman vesículas llamadas caveosomas, que contienen cav-1 en su membrana y poseen un pH neutro. Estos caveosomas se dirigen al aparato de Golgi y el retículo endoplasmático evitando los lisosomas (Perret y col, 2005; Arsianti y col, 2010), aunque algunos autores proponen que, pese a que esta es la ruta principal, algunos caveosomas podrían entrar en la vía endosomal (Lühmann y col, 2008).

Las caveolas presentan otras funciones a parte de la endocitosis, entre las que se encuentran la transcitosis o la regulación de diversas rutas de señalización intracelular (Parton y Simmons, 2007).

1.2.4. Endocitosis mediada por receptor e independiente de clatrina y caveolina

Bajo este nombre se engloban una serie de mecanismos que no son dependientes ni de clatrina ni de caveolina. Aunque apenas se conocen datos sobre estas vías, parecer ser que se asocian con unas regiones membranosas ricas en lípidos y resistentes a la digestión por detergentes, conocidas como balsas lipídicas (*lipid rafts*), cuya composición es similar a la de las caveolas (Bareford y Swaan, 2007; Sandvig y col, 2008). Algunos de los mecanismos independientes de clatrina y caveolina (Sandvig y col, 2011) más conocidos son:

- **Endocitosis dependiente de Rho A y de Cdc 42:** ambos mecanismos dependen de la presencia de balsas lipídicas (Howes y col, 2010a; Kumari y col, 2010). Además, la endocitosis mediada por Rho A, requiere de la intervención de la dinamina y actúa de forma constitutiva en la internalización del receptor de la interleukina-2 (Lamaze y col, 2001) y de la toxina de C2 de *Clostridium Botulinum* (Gibert y col, 2011; Pust y col, 2010). Por otro lado, el mecanismo dependiente de Cdc 42 interviene en la internalización de fluidos (Howes y col, 2010b; Kumari y col, 2010), así como de proteínas unidas a glucosil-fosfatidilinositol (GPI) (Kumari y col, 2010).
- **Endocitosis mediada por flotilina:** la flotilina-1 y -2 son proteínas asociadas a balsas lipídicas. Están implicadas en procesos endocíticos tanto dependientes de dinamina, como es el caso de la internalización de determinados proteoglicanos (Payne y col, 2007), como independientes de ésta, como sucede con las proteínas unidas a GPI o la toxina B del cólera (Glebov y col, 2006). Los microdominios con flotilina no suelen internalizarse con frecuencia, estando el proceso regulado por la kinasa Fyn (Riento y col, 2009).
- **Endocitosis mediada por Arf6:** se trata de otro proceso de internalización dependiente de dinamina (Grant y Donaldson, 2009). Por este mecanismo se internalizan el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I o las integrinas (Grant y Donaldson, 2009).

1.3. Factores que determinan el mecanismo endocítico

El mecanismo exacto por el que una molécula penetra en las células depende de diversos factores (Hillaireau y Couvreur, 2009) tales como:

1.3.1. Tamaño de la molécula

El rango de tamaños que es capaz de internalizar cada vía endocítica es objeto de debate, existiendo una gran controversia al respecto, si bien la mayoría de estudios apuntan a que los compuestos internalizados por endocitosis mediada por clatrina tienen un tamaño comprendido entre 60-200 nm (Erhlich y col, 2004; Cheng y col, 2007), mientras que en el caso de la endocitosis mediada por caveolina, el rango está entre 50-100 nm (Parton y col, 2006; Doherty y McMahon, 2009). Los compuestos internalizados por macropinocitosis pueden llegar hasta los 5 μm (Kerr y Teasdale, 2009; Arsianti y col, 2010).

Por otro lado, el tamaño de las partículas que una célula puede endocitar también depende del tipo celular. Un ejemplo son las microesferas de ADN recubiertas de poliestireno, que tienen un tamaño comprendido entre 20 y 1000 nm. Mientras determinadas líneas celulares, como HUVEC o ECV 304, no son capaces de endocitar estas partículas, otras líneas como HepG-2 o KLN 205, endocitan partículas entre 20 y 100 nm o entre 20 y 600 nm respectivamente (Zauner y col, 2001).

1.3.2. Carga del compuesto

Teniendo en cuenta la carga negativa del interior celular respecto al medio extracelular, los compuestos con carga positiva se asocian más fácilmente con ésta y se internalizan mejor. Este es el motivo por el que las nanopartículas empleadas en estudios biomédicos suelen estar recubiertas de polímeros catiónicos (Mao y col, 2005; Harush-Frenkel y col, 2007; Cañete y col, 2010).

1.3.3. Modificaciones del compuesto

Empleando diversos recubrimientos se puede influir en el mecanismo de internalización. Es el caso de las nanopartículas recubiertas de poli-etilenglicol (PEG), que son reconocidas por los receptores LDL y endocitadas por un

mecanismo dependiente de clatrina, acumulándose en los lisosomas (Kreuter, 2001; Kim y col, 2007).

Otra posibilidad es conjugar el compuesto con ligandos específicos de un receptor determinado, lo que permite dirigir el complejo hacia un tipo celular concreto y/o seleccionar el mecanismo preciso por el que es internalizado. Uno de estos ligandos es el ácido fólico (FA), que se ha estudiado ampliamente como vehículo de agentes terapéuticos, especialmente para el tratamiento del cáncer (Chavanpatil y col, 2006; Low y Kularatne, 2009). El FA es reconocido por el receptor de folato (FR), que está sobreexpresado en muchas líneas tumorales (Lu y Low, 2002; Hilgenbrinck y Low, 2005; Low y Kularatne, 2009) y que se internaliza por un mecanismo dependiente de receptor, evitando el compartimento ácido (Hilgenbrinck y Low, 2005). Pese a que en determinados casos este mecanismo parece estar mediado por caveolinas (Dauty y col, 2002), el mecanismo general por el que se produce la internalización no está claro (Sabharanjak y Mayor, 2004; Hilgenbrinck y Low, 2005). El FA se ha empleado para modificar nanopartículas (Stella y col, 2000; Talekar y col, 2011), liposomas (García-Díaz y col, 2011; Kolhatkar y col, 2011) o micelas (Lee y col, 2005), y en todos los casos se observaba un incremento de la acumulación de estos compuestos en células que expresaban FR.

Otros ligandos estudiados son la transferrina, que se internaliza mayoritariamente por endocitosis mediada por clatrina, acumulándose en los lisosomas (Qian y col, 2002; Sahoo y Labhasetwar, 2005; Kolhatkar y col, 2011), y determinadas moléculas de adhesión celular como los péptidos RGD (Schifferles y col, 2003; Kolhatkar y col, 2011) o el péptido TAT (Lewin y col, 2000; Jones, 2008).

1.3.4. Tipo celular

La expresión diferencial de receptores en los distintos tipos celulares, determina que las capacidades endocíticas varíen en función del tejido (McMahon y Boucrot, 2011). Este es el caso antes comentado de los receptores de folato, que están sobreexpresados en células tumorales (Hilgenbrinck y Low, 2005).

1.3.5. Forma del compuesto

No existe consenso respecto a la influencia de la forma de los compuestos en su internalización. Mientras algunos estudios apuntan a que compuestos esféricos tienen más facilidad para entrar en las células (Chithrani y col, 2006; Muro y col, 2008), otros trabajos sugieren que las partículas con formas cilíndricas o alargadas son capaces de penetrar mejor (Gratton y col, 2008a; b). Esta variabilidad de resultados puede deberse a otros factores como la naturaleza del compuesto, su tamaño o la carga, pudiendo estar varias rutas endocíticas actuando a la vez.

2.1. Resumen

Nosotros hemos estudiado el mecanismo de internalización de la ftalocianina de zinc (II) (ZnPc), para determinar la influencia del vehiculizante y de la línea celular en los mecanismos de endocitosis de esta droga.

El FS se vehiculizó de dos maneras: incluido en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o disuelto en dimetilformamida (DMF). Las líneas celulares que se han utilizado en este estudio han sido HeLa y A-549.

Se usaron distintos inhibidores de las distintas rutas endocíticas, y se valoró el efecto que la presencia de éstos tenía sobre los cambios inducidos por los tratamientos fotodinámicos en la supervivencia celular y en la morfología nuclear, así como sobre la localización subcelular del FS.

Los resultados obtenidos indican que la ZnPc incluida en liposomas penetra en ambos tipos celulares por un mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina. Sin embargo, la ruta de internalización del FS disuelto en DMF difiere en función del tipo celular: en células A-549 se incorpora por un mecanismo dependiente de caveolinas, mientras que en células HeLa la internalización está mediada por un mecanismo independiente de clatrina y caveolinas.

2.2. Objetivos

- Caracterizar el mecanismo de internalización del FS ZnPc en células A-549 y HeLa.
- Determinar la influencia del mecanismo de vehiculización sobre la ruta endocítica de la ZnPc.
- Valorar si existen diferencias en la ruta de internalización de la ZnPc en función de la línea celular.

2.3. Resultados. Células A-549

2.3.1. Tratamientos fotodinámicos en ausencia de inhibidores

2.3.1.1. Supervivencia celular

Las variaciones en la supervivencia de las células A-549, incubadas con ZnPc vehiculizada en liposomas (ZnPc-lip) o disuelta en DMF (ZnPc-DMF) durante distintos tiempos (1, 3 o 24 h), se pueden observar en la Tabla 1.

En ausencia de irradiación, las incubaciones con ZnPc-lip o ZnPc-DMF durante 1 o 3 h no afectan de forma significativa a la viabilidad celular. Por el contrario, los tratamientos durante 24 h con ambos vehiculizantes, reducen la viabilidad celular entre un 20 y un 25%.

Cuando las células se irradiaron durante 10 minutos, después de las mismas incubaciones con el FS, las células incubadas con ZnPc-DMF durante 3 h presentaban un descenso de la supervivencia celular de más de un 80%, mientras que el resto de tratamientos provocaban una inactivación casi total de los cultivos.

Tabla 1. Supervivencia de las células A-549 sometidas a los distintos tratamientos, tanto en presencia como en ausencia de irradiación.

Tratamientos	SIN IRRADIACIÓN		10 MIN IRRADIACIÓN	
	Supervivencia celular (%)	DE	Supervivencia celular (%)	DE
Control	100	5	100	7,6
ZnPc-lip 1h	98,07	3,81	6,24	7,45
ZnPc-lip 3h	97,23	5,43	2,31	1,28
ZnPc-lip 24 h	78,01	5,47	2,12	2,21
ZnPc-DMF 3 h	92,84	0,93	17,59	8,34
ZnPc-DMF 24 h	77,88	6,23	2,87	5,02

Los datos obtenidos representan la media y la desviación estándar (DE) de al menos seis experimentos distintos.

2.3.1.2. Morfología nuclear

Se realizaron estudios morfológicos 24 h después de los tratamientos, para caracterizar los cambios producidos en la morfología nuclear, procesando las células con H-33258. Los resultados se muestran en la figura 1. En ausencia de irradiación, ninguno de los tratamientos provoca cambios morfológicos significativos, presentando las células un aspecto similar al de los controles (Fig. 1A).

Por el contrario, tras 10 min de irradiación, las células tratadas con ZnPc-lip durante 1 h (Fig. 1B), sufrieron una inactivación generalizada, presentando un núcleo pequeño, redondo y con una cromatina altamente compactada, que se corresponde con un proceso de muerte por necrosis. Los tratamientos con ZnPc-DMF durante 24 h y con ZnPc-lip durante 3 o 24 h, originaban unas alteraciones nucleares similares, observándose que la mayor parte de las células presentaba un núcleo mayor de lo normal, con la cromatina condensada, distribuida en pequeñas masas y una envoltura nuclear aparentemente intacta (Fig. 1C).

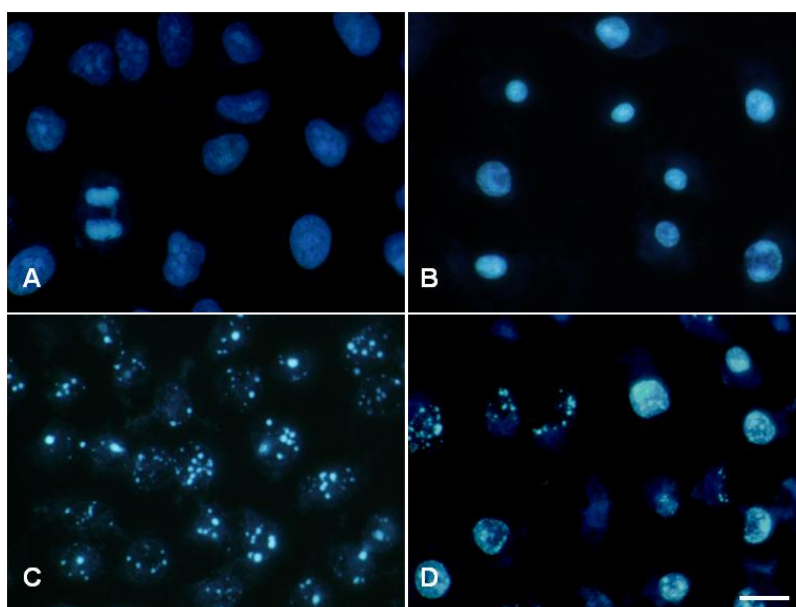


Figura 1. Células A-549 fijadas 24 h después de los tratamientos y procesadas con H-33258. **A:** células control. **B:** células tratadas con ZnPc-lip 1 μ M durante 1 h e irradiadas 10 min. **C:** células tratadas con ZnPc-lip 1 μ M durante 3 h e irradiadas 10 min. **D:** células incubadas ZnPc-DMF 2 μ M durante 3 h e irradiadas 10 min. Barra de escala: 20 μ m.

Esta morfología, como vimos en el anterior capítulo, parece corresponder a una muerte por necrosis regulada. Finalmente, las células tratadas durante 3 h con ZnPc-DMF (Fig. 1D) presentaban ambos tipos de morfologías.

2.3.1.3. Localización subcelular

Se estudió la localización subcelular del fotosensibilizante después de los distintos tiempos de incubación. Los resultados se muestran en la figura 2. En las células incubadas con ZnPc-DMF durante 3 h o con ZnPc-lip durante 1 h, no era posible localizar la fluorescencia roja del fotosensibilizante en el interior celular. En este caso, la morfología de las células es igual a la de los controles (Fig. 2A), observándose únicamente la autofluorescencia azul de la mitocondrias en el citoplasma celular. Por el contrario, las muestras incubadas con ZnPc-lip durante 3 y 24 h, o con ZnPc-DMF 24 h, presentaban en todos los casos una intensa fluorescencia de color rojo, correspondiente al FS, en posición perinuclear, así como algunos gránulos dispersos por el citoplasma (Fig. 2B).

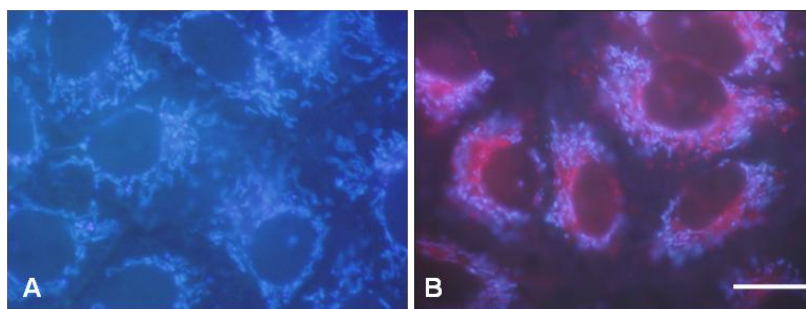


Figura 2. Células A-549 observadas en microscopia de fluorescencia, bajo excitación con luz UV, sin ningún procesamiento. **A:** células control. **B:** células incubadas con ZnPc-lip 1 μ M durante 24 h. Barra de escala: 20 μ m.

2.3.2. Tratamientos con inhibidores de la endocitosis

2.3.2.1. Supervivencia celular

En la figura 3 podemos observar el efecto que producen los distintos inhibidores en la supervivencia de los cultivos celulares. Cuando se incubaban las células durante 2 h, únicamente la M β CD afecta la supervivencia de los cultivos, que se reduce en un 20%. El resto de los inhibidores no afectan de forma significativa la supervivencia celular, que se mantiene en todos los casos

entre el 90 y el 100%. Los resultados obtenidos tras 4 h de incubación son similares a los observados con 2 h de incubación.

Con 25 h de incubación, CD, Gen y M β CD provocan un moderado descenso de la supervivencia de los cultivos celulares, que se situaba entre el 60 y el 75%. Por otro lado, el Dyn reduce drásticamente la viabilidad celular hasta un 40%.

Cuando los cultivos celulares se irradiaban 10 min en las mismas condiciones experimentales, los resultados eran prácticamente idénticos, lo que indica que ninguno de los inhibidores empleados en el estudio presenta un comportamiento fotodinámico.

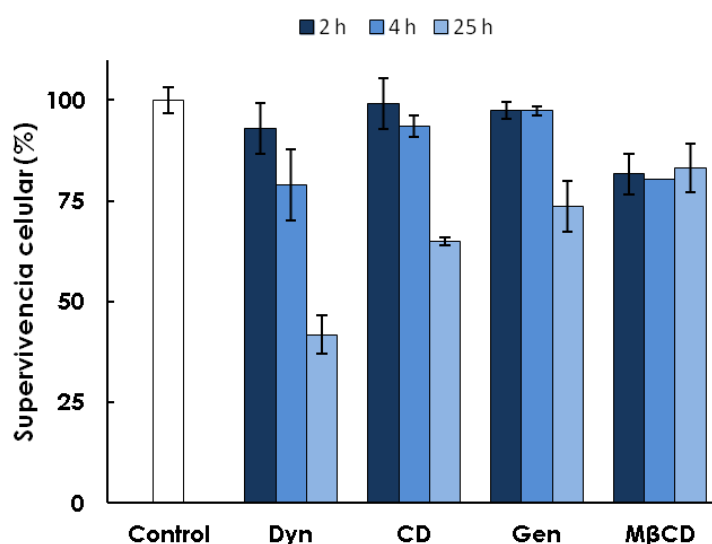


Figura 3. Supervivencia de las células A-549, incubadas con los distintos inhibidores durante diferentes tiempos. Los datos corresponden a la media y la DE de al menos seis experimentos independientes

2.3.2.2. Morfología nuclear

La observación morfológica de las células fijadas y teñidas con H-33258 (Fig. 4), mostró que con tiempos cortos de incubación (2 y 4 h), ninguno de los inhibidores, excepto la CD, afecta la morfología nuclear, que permanecía idéntica a la de las células control (Fig. 4A). Las células incubadas durante 25 h con Dyn (Fig. 4C), sufren un descenso significativo de la densidad celular. Además encontramos numerosos núcleos de morfología apoptótica. Por otro lado, las células tratadas con CD (Fig. 4B), muestran una binucleación proporcional al tiempo de incubación, debido a que este compuesto bloquea

la polimerización de los filamentos de actina, impidiendo que durante la mitosis se produzca la citocinesis. El resto de inhibidores no provocan alteraciones morfológicas significativas tras 25 h de incubación.

A la vista de los cambios morfológicos y en la supervivencia, ocasionados por la CD, decidimos realizar un estudio más profundo de este inhibidor, para valorar sus posibles efectos secundarios.

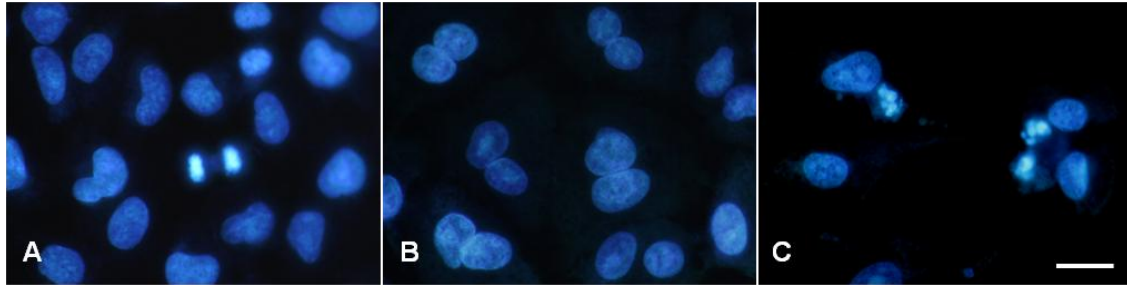


Figura 4. Células A-549 fijadas 24 h después de los tratamientos y procesadas con H-33258. **A:** células control. **B:** células incubadas con CD 5µg/ml durante 25 h. **C:** células incubadas con Dyn 80 µM durante 25 h. Barra de escala: 20 µm.

2.3.3. Tratamientos con CD

2.3.3.1. Microfilamentos de actina

En la figura 5 se observan los cambios producidos por la CD sobre los microfilamentos de actina.

Las células incubadas durante 2 h con CD y procesadas inmediatamente después (Fig. 5C), sufrían un clara desorganización de la actina, perdiendo las fibras de estrés y adquiriendo un aspecto estrellado. Transcurridas 24 h desde el tratamiento (Fig. 5D), las células presentan una morfología idéntica a la de los controles (Fig. 5A y B), observándose de nuevo las fibras de estrés reorganizadas. Las células incubadas en presencia de CD durante 25 h y procesadas inmediatamente (Fig. 5E), presentaban también una fuerte alteración morfológica, con una actina totalmente desorganizada y pérdida de las fibras de estrés. Además, se observa una binucleación generalizada de las células, encontrándose los núcleos en una posición excéntrica. Sin embargo, 24 h después de retirar el tratamiento (Fig. 5F), las células vuelven a recuperar una morfología normal, presentando fibras de estrés bien definidas y núcleos en posición central, aunque la binucleación se mantiene.

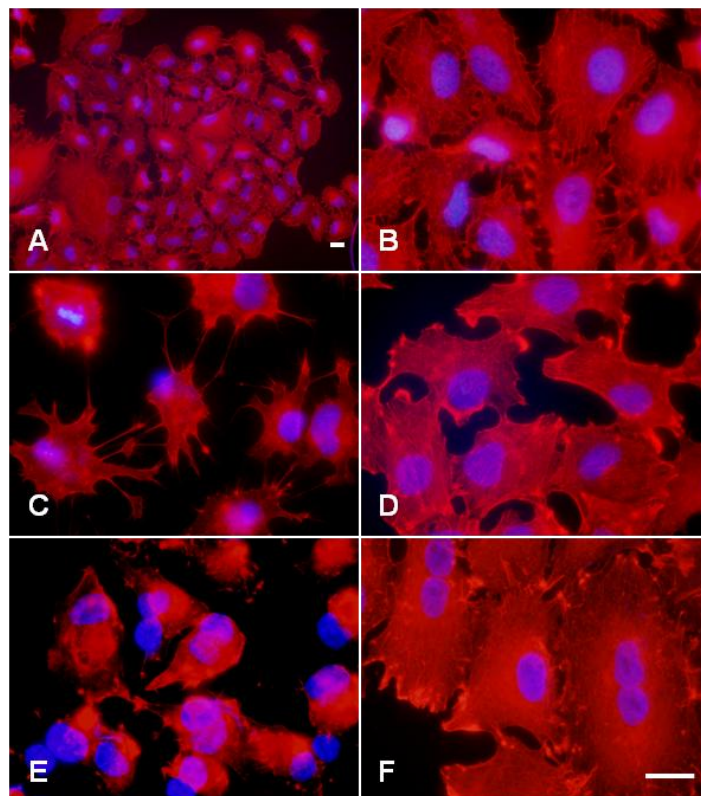


Fig. 5. Células A-549 fijadas a distintos tiempos después de los tratamientos, teñidas con TRITC-faloidina y contrateñidas con H-33258. **A y B:** células control. **C:** células incubadas 2 h con CD y fijadas inmediatamente después del tratamiento. **D:** células incubadas 2 h con CD y fijadas 24 h después del tratamiento. **E:** células incubadas 25 h con CD y fijadas inmediatamente después del tratamiento. **F:** células incubadas 25 h con CD y fijadas 24 h después del tratamiento Barra de escala: 20 μ m.

2.3.3.2. Microtúbulos

Se valoró mediante inmunofluorescencia indirecta para tubulina, el efecto que este tratamiento tenía sobre la estructura de los microtúbulos y el índice mitótico. Las células se procesaron a las 0 y 24 h después de los tratamientos con CD. Además, dado que las células incubadas con CD durante 2 h, no presentaban cambios significativos 24 h después de los tratamientos con respecto a los controles, se evaluó el efecto a las 4 h de retirar el inhibidor, con el fin de determinar si a un tiempo más corto se observaba alguna alteración relevante. Con los tratamientos de 24 h de incubación, al producir una significativa reducción de la supervivencia y una binucleación generalizada a las 24 h de finalizar los tratamientos, se evaluaron las células a las 48 h de retirar

la CD, para determinar el efecto del inhibidor a largo plazo. Los resultados se muestran en la figura 6.

En las células incubadas 2 h con CD, vemos que inmediatamente después del tratamiento (Fig. 6B), la morfología celular se ve muy alterada con respecto a las células control (Fig. 6A), apreciándose un núcleo deformado y periférico. Cuando las observaciones se realizaron 4 h después de retirar la CD (Fig. 6C), la morfología de las células es equivalente a la de los controles, aunque hay un número ligeramente mayor de células binucleadas. A las 24 h de finalizar el tratamiento (Fig. 6D), la morfología celular es equivalente a la observada a las 4 h.

Las células tratadas con CD durante 25 h y procesadas inmediatamente después de la incubación (Fig. 6E), también mostraban una morfología celular muy alterada, con unos núcleos que parecen de nuevo encontrarse fuera de la célula. Pese a esta fuerte alteración morfológica, los microtúbulos parecen conservar cierta integridad. A las 24 h del tratamiento las células presentan una morfología similar a las células control, pero con un elevado porcentaje de células binucleadas (Fig. 6F). Esta binucleación se mantenía 48 h después de los tratamientos.

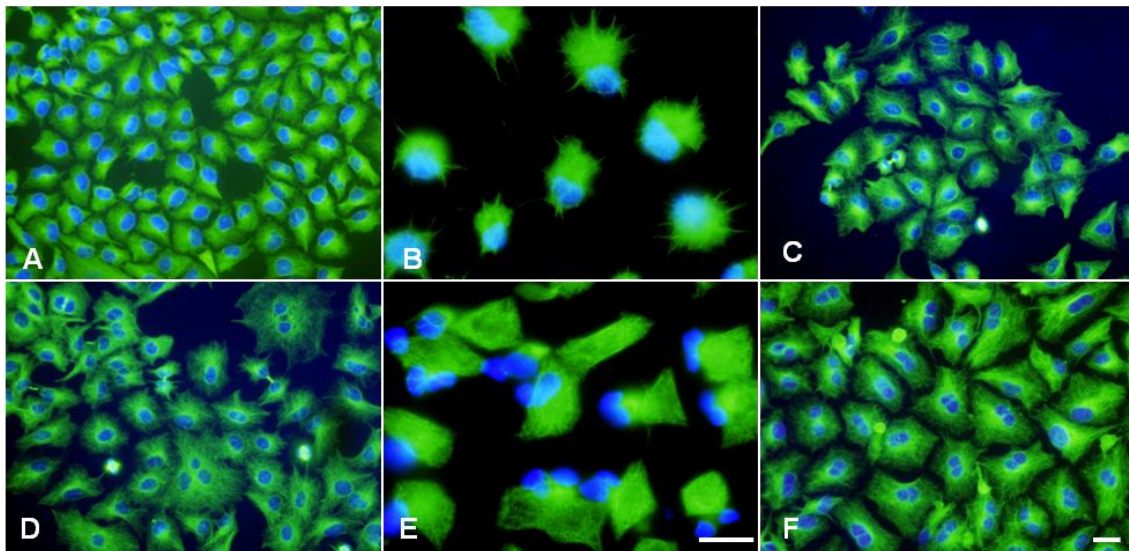


Fig. 6. Células A-549 incubadas con CD, fijadas a distintos tiempos postincubación, procesadas para inmunofluorescencia indirecta de α -tubulina y contrateñidas con H-33258. **A:** control. **B:** células incubadas 2 h con CD y fijadas inmediatamente después del tratamiento. **C:** células incubadas 2 h con CD y procesadas 4 h después. **D:** células tratadas durante 2 h con CD y fijadas 24 h después. **E:** células incubadas 24 h con CD y fijadas inmediatamente después del tratamiento. **F:** células tratadas 24 h con CD y procesadas 24 h después del tratamiento. Barra de escala: 20 μ m.

2.3.3.3. Binucleación e índice mitótico

Se realizaron recuentos de las células incubadas 2 y 25 h con CD y procesadas a distintos tiempos después de los tratamientos, para determinar el número de binucleadas y el índice mitótico.

Cuando la incubación con CD se realizó durante 2 h (tabla 2) y las células se procesaron inmediatamente después, no fue posible determinar con exactitud el número de células binucleadas debido, tanto a la fuerte alteración morfológica de las células como a la localización excéntrica de los núcleos. En células fijadas 4 h después de retirar el inhibidor, se observó que el número de binucleadas se incrementaba hasta un 9,2%, frente al 4,3%, que presentan los controles. Estos valores se mantenían a las 24 h de retirar la CD.

Respecto al índice mitótico, se vio un descenso de éste respecto a los controles, en las células incubadas con CD y fijadas inmediatamente después de retirar el inhibidor, aunque se recupera rápidamente, presentando a las 4 h de postincubación un valor similar al de los controles.

Tabla 2. Índice mitótico y porcentaje de binucleación en células A-549, incubadas en presencia de CD durante 2 h y procesadas a distintos tiempos después del tratamiento.

	Índice mitótico (%) \pm DE	Binucleadas (%) \pm DE
Control	2,67 \pm 0,32	4,34 \pm 1,2
CD 2 h + 0 h	1,36 \pm 0,21	-----
CD 2 h + 4 h	2,83 \pm 0,37	9,26 \pm 1,73
CD 2 h + 24 h	2,59 \pm 0,41	8,28 \pm 1,45

Los datos obtenidos representan la media de tres experimentos distintos \pm la desviación estándar (DE). En cada muestra experimental se contaron un mínimo de 3000 células.

También se realizaron recuentos para determinar el número de células binucleadas y el índice mitótico después de 25 h de incubación con CD (tabla 3). En cuanto al número de células binucleadas, no fue posible tampoco realizar un recuento inmediatamente después de la incubación con CD, pero si se realizó tanto a las 24 h como a las 48 h después de finalizar los

tratamientos, apreciándose un incremento del número de células binucleadas de un 61% después de 24 h y un 71% a las 48 h. Por otro lado, en las muestras fijadas inmediatamente después de retirar la CD, también se observa un descenso del índice mitótico respecto a los controles. Este descenso se mantiene a las 24 h y a las 48 h después de retirar el inhibidor.

Tabla 3. Índice mitótico y porcentaje de binucleación en células A-549, incubadas en presencia de CD durante 25 h y procesadas a distintos tiempos después del tratamiento.

	Índice mitótico (%) \pm DE	Binucleadas (%) \pm DE
Control	2,67 \pm 0,32	4,34 \pm 1,2
CD 25 h + 0 h	1,59 \pm 0,31	-----
CD 25 h + 24 h	1,48 \pm 0,26	61,32 \pm 4,92
CD 25 h + 48 h	1,06 \pm 0,22	71,50 \pm 6,08

Los datos obtenidos representan la media de tres experimentos distintos \pm la desviación estándar (DE). En cada muestra experimental se contaron un mínimo de 3000 células.

2.3.4. Tratamientos fotodinámicos con ZnPc en presencia de inhibidores de la endocitosis

2.3.4.1. Supervivencia celular

En la figura 8 podemos ver el efecto de los distintos inhibidores en la fotoinactivación celular producida por ZnPc. Los tratamientos fotodinámicos con ZnPc-lip (Fig. 8A), muestran que solo el Dyn es capaz de inhibir la internalización del FS. Las células incubadas durante 1 h con ZnPc en presencia de este inhibidor, presentan una inactivación celular del 20%, frente al 100% causado por la ZnPc sola. Con tratamientos fotodinámicos después de 3 h de incubación, las células tratadas con ZnPc-lip+Dyn presentan una mortalidad celular del 70%, frente al 100% que se obtiene en los tratamientos con ZnPc en ausencia del Dyn. Finalmente, tras 24 h de incubación con el FS, no se observan diferencias entre la supervivencia de las células tratadas solo con ZnPc-lip o con ZnPc-lip+Dyn, produciéndose en ambos casos una inactivación total de los cultivos. Esto indica que la eficacia inhibitoria del Dyn decae según

incrementamos el tiempo de incubación. El resto de inhibidores no parecen afectar a la internalización de ZnPc-lip, en ninguno de los tiempos estudiados.

Los tratamientos fotodinámicos con ZnPc-DMF durante 3h de incubación (Fig. 8B) en presencia de Dyn, CD y Gen resultan sensiblemente menos eficaces. Mientras la ZnPc reduce la viabilidad celular en un 80%, en presencia de estos inhibidores el porcentaje de células inactivadas es mucho menor: 30% en presencia de Dyn o Gen, y 50% con CD. Por el contrario, la presencia M β CD incrementa la proporción de células muertas, causando una inactivación total de los cultivos. En las células incubadas durante 24 h con ZnPc-DMF, observamos que el Dyn, la CD y la Gen mantenían su capacidad de inhibir significativamente el efecto fotodinámico de la ZnPc. Por el contrario, los tratamientos fotodinámicos en presencia de M β CD durante 24h, producían de nuevo una inactivación total de los cultivos.

En ausencia de irradiación, los valores de supervivencia celular obtenidos con los tratamientos con ZnPc en presencia de los inhibidores, eran iguales a los obtenidos en los tratamientos con los inhibidores en ausencia del FS.

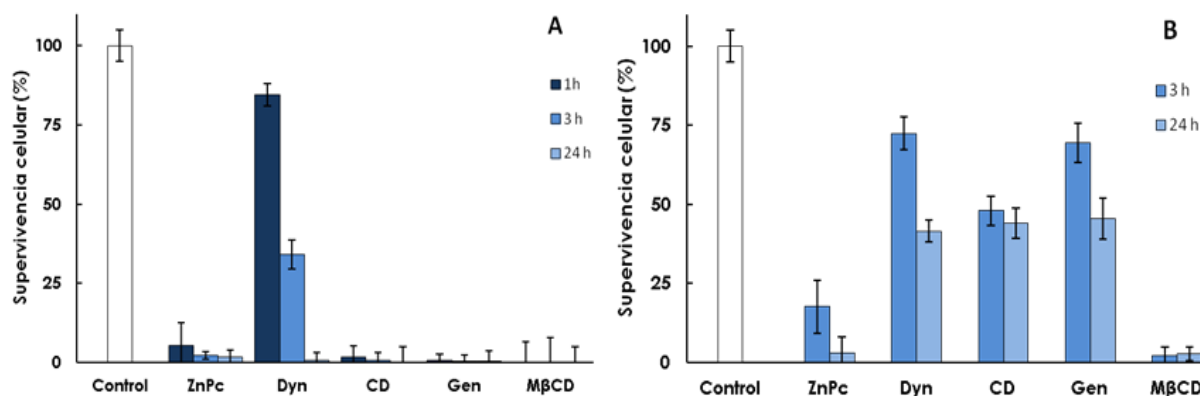


Figura 8. Supervivencia de las células A-549, tratadas con ZnPc sola o en presencia de los distintos inhibidores, durante diferentes tiempos e irradiadas posteriormente. **A:** células tratadas con ZnPc-lip. **B:** células tratadas con ZnPc-DMF. Los datos corresponden a la media y la DE de tres experimentos independientes.

2.3.4.2. Morfología nuclear

En la figura 9, podemos observar la morfología de las células sometidas a tratamientos fotodinámicos con ZnPc-lip en presencia de los distintos inhibidores. Las células tratadas con ZnPc-lip en presencia de estos inhibidores, no ocasionaron variaciones en la morfología nuclear con respecto a la

producida con los tratamientos fotodinámicos en su ausencia, con excepción del Dyn y la CD.

Los tratamientos con ZnPc-lip durante 1 h en presencia del Dyn presentan una morfología nuclear idéntica a la de las células control (Fig. 9A), pero en los tratamientos de 3 h se reduce la densidad celular y aparecen algunos núcleos apoptóticos, aunque la mayoría de las células no presenta alteraciones nucleares (Fig. 9B). Esta alteración es la misma que se produce cuando se incuba con el Dyn en ausencia de tratamientos fotodinámicos. Los tratamientos de 24 h en presencia de Dyn producen una inactivación total de los cultivos por un proceso fundamentalmente necrótico (Fig. 9C).

Por otra parte, en los tratamientos fotodinámicos de 1h con ZnPc-lip+CD, en presencia del inhibidor, la mayoría de las células presentan núcleos claramente necróticos, resultado idéntico al que ocasiona la ZnPc en ausencia de inhibidor. Los tratamientos con ZnPc-lip+CD, tanto con 3 como con 24 h de incubación, producen una inactivación generalizada por un proceso también de tipo necrótico, presentando una morfología distinta a la que se obtiene con esos mismos tratamientos en ausencia de CD.

En el caso de los tratamientos fotodinámicos con ZnPc-DMF en presencia de Gen, CD o Dyn durante 3 o 24 h, las células presentan la misma morfología nuclear que las tratadas solo con los inhibidores. Finalmente, la presencia de M β CD, no altera el tipo de morfología nuclear producido por la ZnPc-DMF, independientemente del tiempo de incubación.

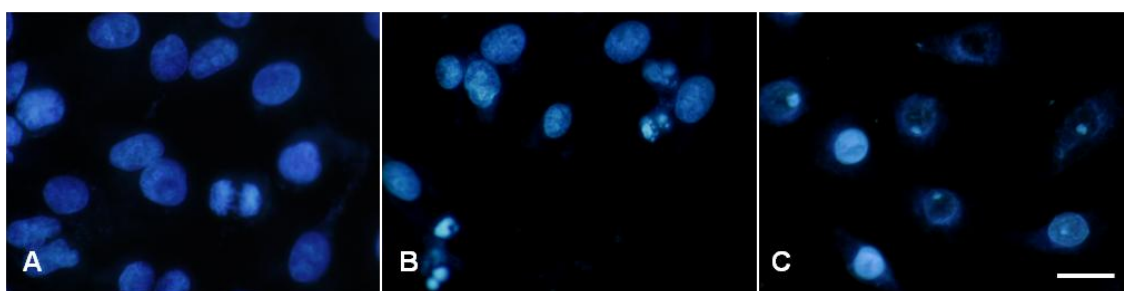


Figura 9. Células A-549 fijadas 24 h después de los tratamientos fotodinámicos y procesadas con H-33258. **A:** células control. **B:** células incubadas 1 h con Dyn y 3 h con ZnPc-lip+Dyn. **C:** células incubadas 1 h con Dyn y 24 h con ZnPc-lip+Dyn. Barra de escala: 20 μ m.

2.3.4.3. Localización subcelular

En la figura 10 podemos observar el efecto de los inhibidores sobre la localización subcelular de la ZnPc-lip. La Gen y la M β CD no afectan a la internalización del FS, tanto con 3 como con 24 h de incubación con el FS, observándose en ambos casos la fluorescencia roja de la ZnPc en posición perinuclear (Fig. 10A).

Con los tratamientos de 3 h de incubación en presencia de Dyn (Fig. 10B), es posible observar cierta fluorescencia roja en el interior celular, si bien dicha emisión es más tenue y difusa que en células tratadas solo con ZnPc-lip. Con 24 h de incubación (Fig. 10C), el FS se puede localizar en el interior celular, lo que confirma que el inhibidor no es eficaz a tiempos largos de incubación. Las muestras tratadas con ZnPc-lip+CD durante 3 o 24 h (Fig. 10D), presentan en su citoplasma la fluorescencia roja del FS, aunque la fuerte alteración de la morfología celular producida por la CD, impide determinar donde se localiza el FS.

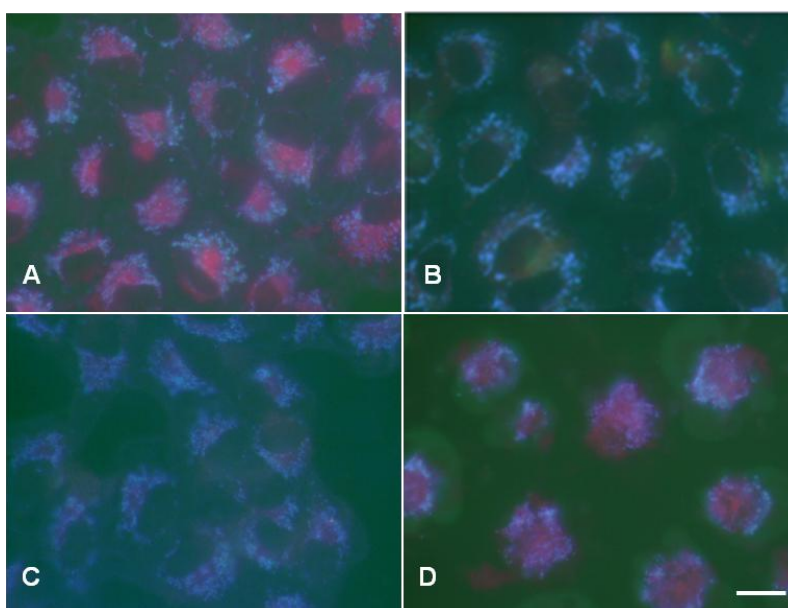


Figura 10. Células A-549 observadas en microscopia de fluorescencia (UV) sin ningún procesamiento. **A:** células incubadas con Gen 1 h más 24 h con ZnPc-lip+Gen. **B:** células incubadas con Dyn 1 h más 3 h con ZnPc-lip+Dyn. **C:** células incubadas 1 h con Dyn y 24 h con ZnPc-lip+Dyn. **D:** células incubadas 1 h con CD más 24 h con ZnPc-lip+CD. Barra de escala: 20 μ m.

Las células incubadas con ZnPc-DMF durante 24 h, presentan la misma fluorescencia perinuclear anteriormente descrita (Fig. 11A). Además, al observarlas en microscopia de campo claro, era posible ver agregados de FS de color azul en la periferia celular (Fig. 11B). En presencia de Dyn, CD o Gen, no era posible localizar el FS en el interior celular (Fig. 11C), aunque en campo claro podíamos ver los agregados de ZnPc sobre la membrana plasmática (Fig. 11D). Las células tratadas con M β CD mostraban la fluorescencia roja del FS en su interior, de forma análoga a las células tratadas solo con ZnPc-DMF.

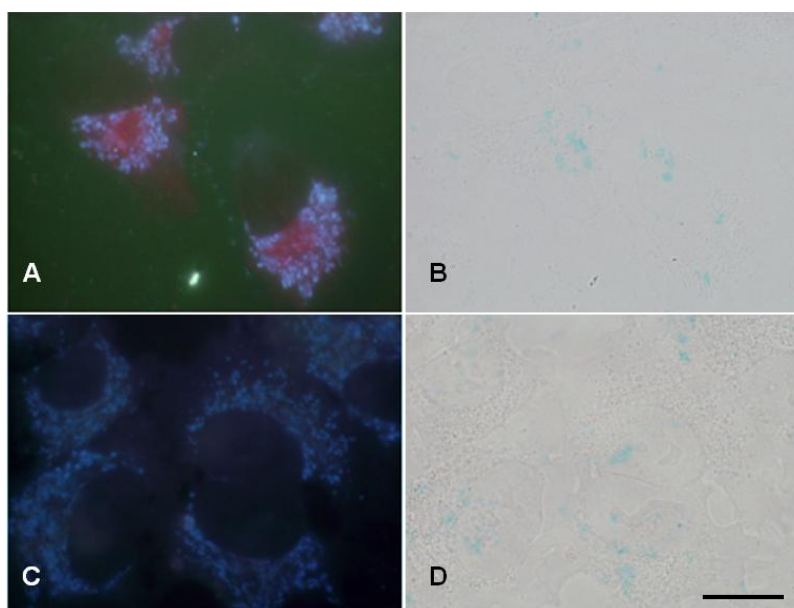


Fig. 11 Células A-549 observadas sin ningún tipo de procesamiento. **A:** células incubadas con ZnPc-DMF 1 μ M durante 24 h, observadas en microscopia de fluorescencia (UV). **B:** las mismas células observadas en campo claro. **C:** células incubadas con Gen 1 h y 24 h más con ZnPc-DMF+Gen, observadas en microscopia de fluorescencia (UV). **D:** el mismo campo observado en campo claro. Barra de escala: 20 μ m.

2.4. Resultados. Células HeLa

2.4.1. Tratamientos fotodinámicos en ausencia de inhibidores

2.4.1.1. Supervivencia celular

Las variaciones en la supervivencia de las células HeLa, incubadas con ZnPc-lip o ZnPc-DMF durante distintos tiempos, se pueden observar en la Tabla 4.

En ausencia de irradiación, las incubaciones durante 1 y 3 h, tanto con ZnPc-lip como con ZnPc-DMF, no afectan de forma significativa a la viabilidad celular. Por el contrario, las incubaciones durante 24 h con ZnPc en ambos vehículos, reducen la viabilidad celular alrededor de un 15%.

Cuando las células incubadas 3 h con ZnPc-DMF, se irradiaron durante 10 minutos, la supervivencia celular no se veía alterada de forma significativa. Por el contrario, las células incubadas con ZnPc-DMF durante 24 h e irradiadas posteriormente, presentaban un descenso de la supervivencia de un 90% aproximadamente. Finalmente, las muestras tratadas con ZnPc-lip durante 1, 3 o 24 h, sufrían una reducción de la supervivencia cercana al 100%.

Tabla 4. Supervivencia de las células HeLa sometidas a los distintos tratamientos, tanto en presencia como en ausencia de irradiación.

Tratamientos	SIN IRRADIACIÓN		10 MIN IRRADIACIÓN	
	Supervivencia celular (%)	DE	Supervivencia celular (%)	DE
Control	100	3,42	100	3,72
ZnPc-lip 1 h	99,49	4,65	8,07	4,64
ZnPc-lip 3 h	98,61	2,91	4,28	4,37
ZnPc-lip 24 h	84,83	4,15	2,7	4,51
ZnPc-DMF 3 h	99,15	5,30	91,56	3,39
ZnPc-DMF 24 h	88,17	4,25	9,38	6,18

Los datos obtenidos representan la media y la desviación estándar (DE) de seis experimentos distintos.

2.4.1.2. Morfología nuclear

Para caracterizar los cambios producidos en la morfología nuclear, las células se procesaron con H-33258 24 h después de irradiar. Los resultados se muestran en la figura 12. En ausencia de irradiación, ninguno de los tratamientos provocaba cambios morfológicos significativos, presentando las células una morfología equivalente a la de las células control (Fig. 12A).

Por el contrario, tras 10 min de irradiación, las células tratadas con ZnPc-lip durante 1 h (Fig. 12B), sufrían una inactivación total por un proceso de tipo necrótico. Las células tratadas con ZnPc-lip durante 3 y 24 h, presentaban unos núcleos con la cromatina muy condensada formando gránulos, así como una envoltura nuclear aparentemente intacta (Fig. 12C). Esta morfología corresponde con un proceso de necrosis regulada, tal como vimos en el capítulo anterior. Las células tratadas con ZnPc-DMF 3 h presentaban un aspecto idéntico al de los controles, mientras que las incubadas durante 24 h con ZnPc-DMF (Fig. 12D) presentaban núcleos necróticos, apoptóticos y granulados, así como algunas células vivas.

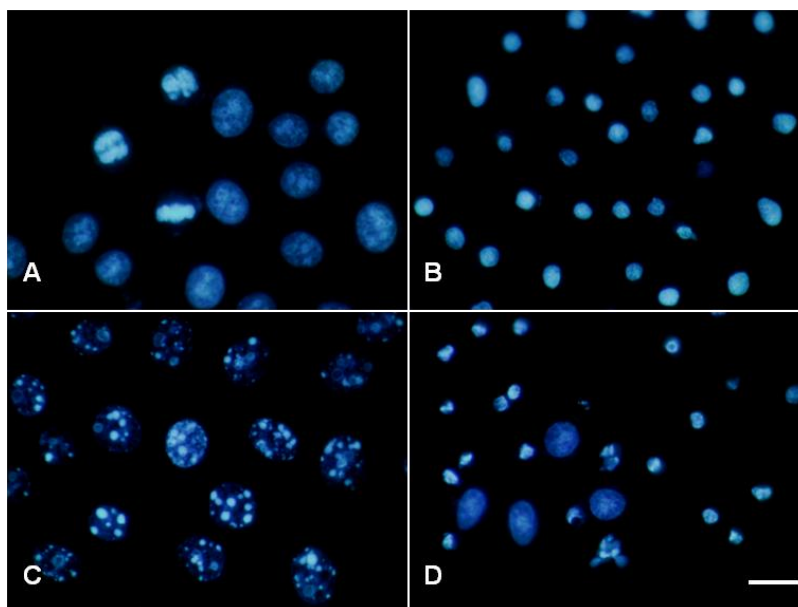


Figura 12. Células HeLa fijadas 24 h después de los tratamientos y procesadas con H-33258. **A:** células control. **B:** células tratadas con ZnPc-lip 1 μ M durante 1 h e irradiadas 10 min. **C:** células tratadas con ZnPc-lip 1 μ M durante 3 h e irradiadas 10 min. **D:** células incubadas ZnPc-DMF 1 μ M durante 24 h e irradiadas 10 min. Barra de escala: 20 μ m.

2.4.1.3. Localización subcelular

También se estudió la localización subcelular del FS después de los distintos tiempos de incubación. Los resultados se muestran en la figura 13. En las células incubadas con ZnPc-lip 1 h, o con ZnPc-DMF durante 3 h, no era posible localizar el FS en el interior celular. Estas células presentaban una morfología similar a la de los controles (Fig. 13A), observándose únicamente la autofluorescencia azul de la mitocondrias. Por el contrario, las células incubadas con ZnPc-lip durante 3 o 24 h, presentaban la fluorescencia roja del FS en posición perinuclear (Fig. 13B).

En las células incubadas con ZnPc-DMF durante 24 h, también era posible detectar en su interior la fluorescencia roja de la ZnPc, aunque en este caso la localización era citoplasmática y difusa, existiendo cierta colocalización con las mitocondrias en algunos casos (Fig. 13C).

Dado que los tratamientos con ZnPc-DMF durante 3 h no alteraban la supervivencia ni la morfología celular, y no era posible localizar el FS en el interior celular, se descartó esta condición experimental para pruebas sucesivas.

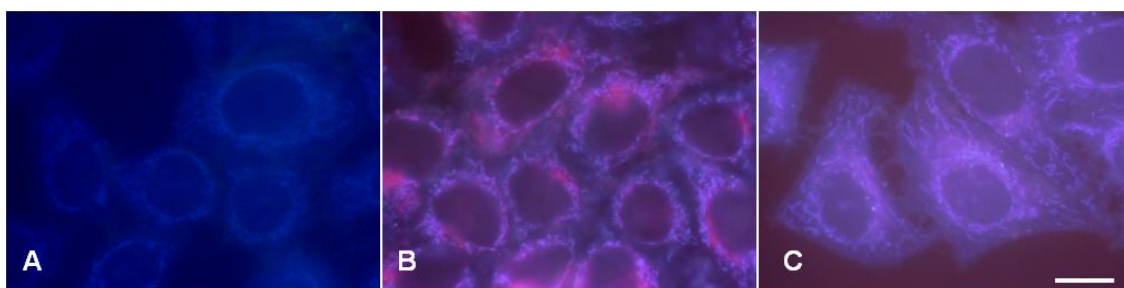


Figura 13. Células HeLa observadas en microscopia de fluorescencia, bajo excitación con luz UV, sin ningún procesamiento. **A:** células control. **B:** células incubadas con ZnPc-lip 1 μ M durante 24 h. **C:** células incubadas con ZnPc-DMF 1 μ M durante 24 h. Barra de escala: 20 μ m.

2.4.2. Tratamientos con inhibidores de la endocitosis

2.4.2.1. Supervivencia celular

En la figura 14 podemos observar el efecto que producen los distintos inhibidores de la endocitosis en la supervivencia de las células HeLa.

Cuando se incubaban las células durante 2 h, ninguno de ellos reducía significativamente la supervivencia celular, que se mantiene en todos los casos

entre el 85% y el 100%. Con tratamientos de 4 h de incubación, los resultados obtenidos son similares a los observados con 2 h de incubación. Las células incubadas durante 25 h con cualquiera de los inhibidores, sufrían un descenso moderado de la supervivencia celular, entre el 25 y el 35%.

Cuando los cultivos celulares se irradiaban bajo las mismas condiciones experimentales los resultados eran idénticos, lo que indica que ninguno de los inhibidores empleados en el estudio presenta actividad fotodinámica bajo nuestras condiciones experimentales

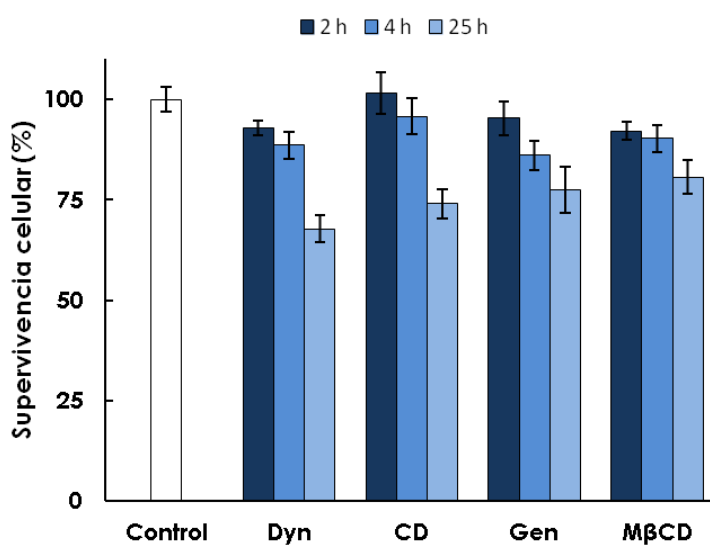


Figura 14. Supervivencia de las células HeLa, incubadas con los distintos inhibidores durante diferentes tiempos. Los datos corresponden a la media y la DE de tres experimentos independientes.

2.4.2.2. Morfología nuclear

La observación de la morfología nuclear de las células tratadas con los inhibidores y teñidas con H-33258 24 h después de los tratamientos (Fig. 15), mostró que en ninguna de las condiciones experimentales, ni la Gen ni la MβCD afectaban la morfología nuclear, que permanecía idéntica a la de las células control (Fig. 15A).

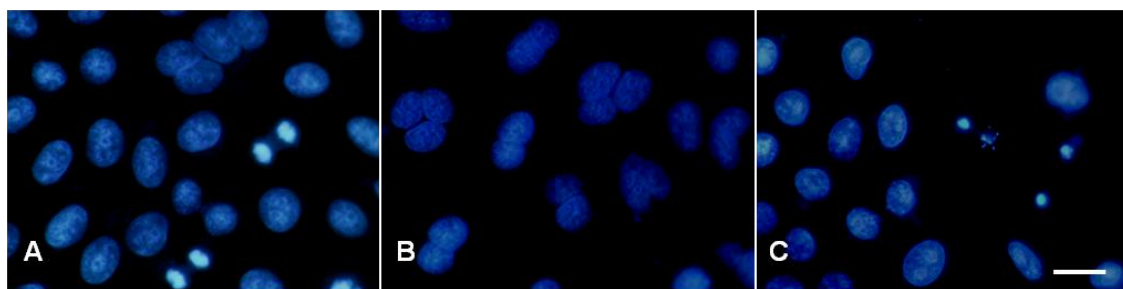


Figura 15. Células HeLa fijadas 24 h después de los tratamientos y procesadas con H-33258. **A:** células control. **B:** células incubadas con CD 5µg/ml durante 25 h. **C:** células incubadas con Dyn 40 µM durante 25 h. Barra de escala: 20 µm.

Las células tratadas con CD (Fig. 15B) sufren una binucleación proporcional al tiempo de incubación. Este comportamiento es análogo al descrito anteriormente en células A-549 tratadas con este mismo inhibidor. Las incubaciones con Dyn durante 2 y 4 h, no alteraban la morfología nuclear, pero con incubaciones de 25 h (Fig. 15C), se podía observar un ligero descenso de la densidad celular, con presencia de algunos núcleos apoptóticos y necróticos.

2.4.3. Tratamientos fotodinámicos en presencia de inhibidores de la endocitosis

2.4.3.1. Supervivencia celular

En la figura 16 podemos ver el efecto de los distintos inhibidores en la fotoinactivación celular producida por ZnPc. Los ensayos de supervivencia, realizados 24 h después de los tratamientos fotodinámicos con ZnPc-lip en presencia de los inhibidores (Fig. 16A), muestran que solo el Dyn es capaz de inhibir la internalización del FS. En células incubadas durante 1 h con ZnPc-lip en presencia de este inhibidor, se observa una reducción de la supervivencia celular en un 25%, frente al 95% causado por la ZnPc sola. Con tratamientos fotodinámicos después de 3 h de incubación, las células incubadas con ZnPc-lip+Dyn presentan un descenso en la supervivencia de un 75%, frente al 100% que se obtiene en los tratamientos con ZnPc en ausencia del Dyn. Finalmente, después de 24 h de incubación con el FS, no se observan diferencias entre la supervivencia de las células tratadas con ZnPc en ausencia o en presencia de Dyn, produciéndose en ambos casos una inactivación total de los cultivos. Esto indica que la eficacia del Dyn decae según incrementamos el tiempo de

incubación. El resto de inhibidores no parecen afectar a la internalización de ZnPc-lip a ninguno de los tiempos estudiados.

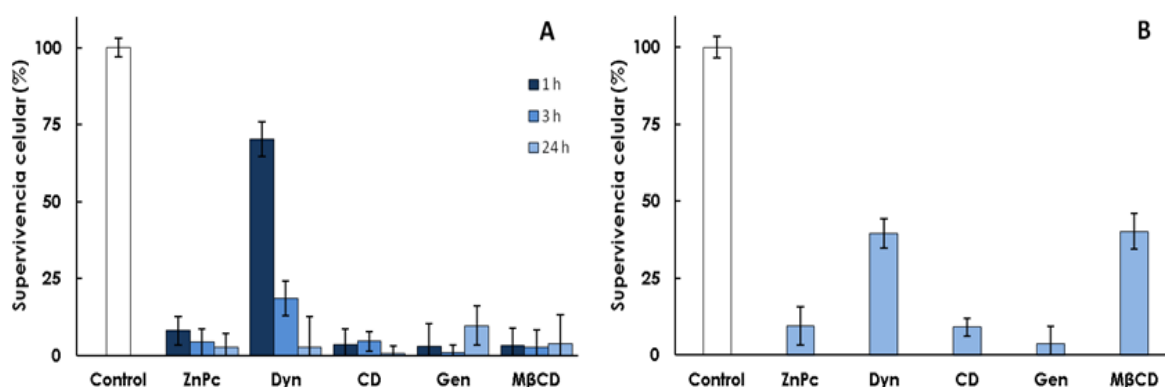


Figura 16. Supervivencia de las células HeLa, tratadas con ZnPc sola o en presencia de los distintos inhibidores e irradiadas posteriormente. **A:** células tratadas con ZnPc-lip durante diferentes tiempos. **B:** células tratadas con ZnPc-DMF durante 24 h. Los datos corresponden a la media y la DE de tres experimentos independientes.

Los tratamientos fotodinámicos de 24 h de incubación con ZnPc-DMF (Fig. 16B), en presencia de Dyn y MβCD resultan significativamente menos eficaces. Mientras los tratamientos solo con el FS reducían la viabilidad celular hasta un 90%, en presencia de estos inhibidores la inactivación celular era de un 60% en ambos casos. Por el contrario, la presencia de CD o Gen no reducía la fototoxicidad causada por la ZnPc, observándose una inactivación de los cultivos cercana al 100%.

En ausencia de irradiación, los valores de supervivencia celular obtenidos con los tratamientos con ZnPc en presencia de los inhibidores, eran iguales a los obtenidos en los tratamientos con los inhibidores en ausencia del FS.

2.4.3.2. Morfología nuclear

Las células tratadas con ZnPc-lip en presencia de los distintos inhibidores e irradiadas, no ocasionaron variaciones en la morfología nuclear, con respecto a la producida con los tratamientos fotodinámicos en ausencia de esos inhibidores, exceptuando los tratamientos en presencia de Dyn y CD (Fig. 17).

Los tratamientos con ZnPc-lip durante 1 h en presencia del Dyn (Fig. 17B) presentan una morfología nuclear idéntica a la de las células control (Fig. 17A), aunque era posible encontrar algunos núcleos apoptóticos, pero en los

tratamientos de 3 h de incubación con el FS, se observa una inactivación celular generalizada, presentando los núcleos una morfología predominantemente necrótica (Fig. 17C).

Los tratamientos de 24 h en presencia de Dyn, producen una inactivación total de los cultivos por un mecanismo también necrótico. Las incubaciones con ZnPc en presencia de CD producen también binucleación en los cultivos, que como ya se ha comentado, es proporcional al tiempo de incubación. Los tratamientos fotodinámicos de 1 h o 24 h en presencia de éste inhibidor, producen la muerte celular por un proceso idéntico al observado con la ZnPc en ausencia de inhibidor. Por el contrario, las células tratadas con ZnPc-lip+CD durante 3 h, muestran una morfología mixta, encontrando células tanto necróticas como con la cromatina granulada (Fig. 17D).

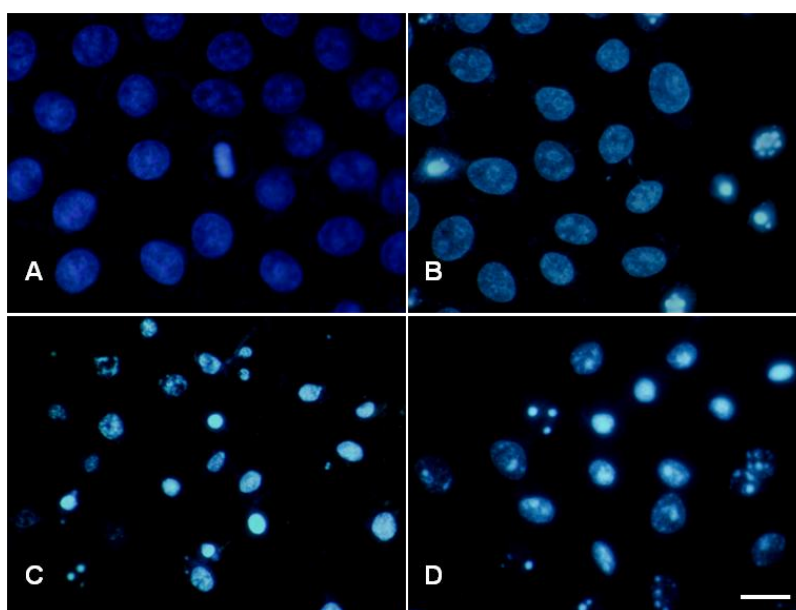


Figura 17. Células HeLa fijadas 24 h después de los tratamientos fotodinámicos y procesadas con H-33258. **A:** células control. **B:** células incubadas 1 h con Dyn y 1 h con ZnPc-lip+Dyn. **C:** células incubadas 1 h con Dyn y 3 h con ZnPc-lip+Dyn. **D:** células incubadas 1 h con CD y 3 h con ZnPc-lip+CD Barra de escala: 20 μ m.

Por otra parte, los tratamientos fotodinámicos con ZnPc-DMF en presencia de Dyn (Fig. 18C) o M β CD (Fig. 18D) durante 24 h, producen una inactivación parcial de los cultivos, encontrando tanto células vivas, con una morfología similar a la de los controles (Fig. 18A), como células con morfología necrótica. Por el contrario los tratamientos fotodinámicos en presencia de CD o Gen,

presentan una morfología nuclear similar a producida por la ZnPc-DMF sola (Fig. 18B).

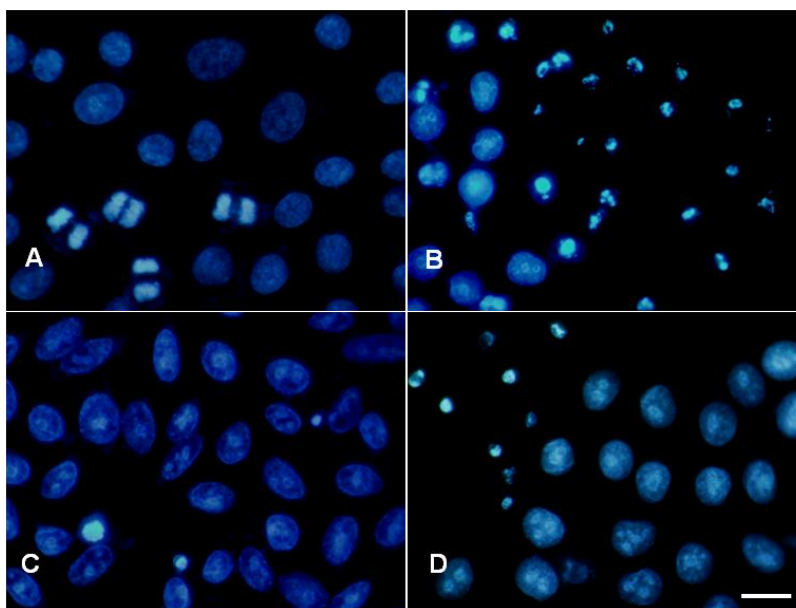


Figura 18. Células HeLa fijadas 24 h después de los tratamientos fotodinámicos y procesadas con H-33258. **A:** células control. **B:** células incubadas con ZnPc-DMF 24 h. **C:** células incubadas 1 h con Dyn y 24 h con ZnPc-DMF+Dyn. **D:** células incubadas 1 h con MβCD y 24 h con ZnPc-DMF+MβCD Barra de escala: 20 μm.

2.4.3.3. Localización subcelular

En la figura 19 podemos observar el efecto de los distintos inhibidores sobre la localización subcelular de la ZnPc-lip. La Gen y la MβCD no afectan a la internalización del FS, tanto con 3 como con 24 h de incubación, observándose en ambos casos la fluorescencia roja del FS en posición perinuclear (Fig. 19A). En presencia de Dyn, con 3 h de incubación (Fig. 19B) es posible observar cierta fluorescencia rojiza en el interior celular, si bien dicha emisión es más tenue y difusa que en células tratadas solo con ZnPc-lip. A las 24 h de incubación (Fig. 19C), el FS se puede localizar en el interior celular en posición perinuclear y adherido a la membrana, lo que confirma que el inhibidor no es eficaz a tiempos largos de incubación. Las células tratadas con ZnPc-lip+CD durante 3 o 24 h (Fig. 19D), presentan en su citoplasma la fluorescencia roja del FS, aunque la fuerte alteración de la morfología celular producida por la CD, impide determinar con exactitud donde se localiza el FS.

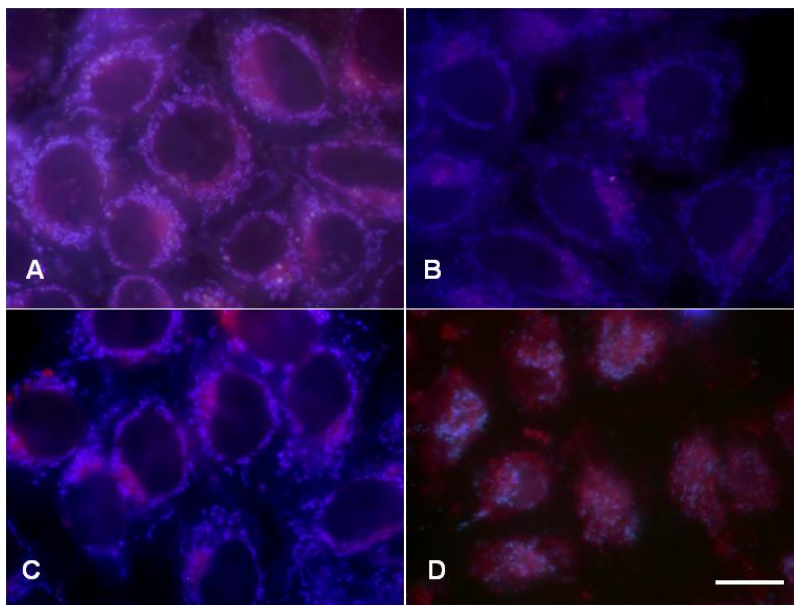


Figura 19. Células HeLa observadas en microscopia de fluorescencia (UV), sin ningún procesamiento. **A:** células incubadas con MβCD 1 h más 24 h con ZnPc-lip+ MβCD. **B:** células incubadas con Dyn 1 h más 3 h con ZnPc-lip+Dyn. **C:** células incubadas 1 h con Dyn y 24 h con ZnPc-lip+Dyn. **D:** células incubadas 1 h con CD más 24 h con ZnPc-lip+CD. Barra de escala: 20 μm.

En las células incubadas con ZnPc-DMF en presencia de Gen (Fig. 20A) o CD (Fig. 20B) se podía distinguir en su interior la fluorescencia roja del FS, localizada difusamente por el citoplasma. Por el contrario, en presencia de Dyn o MβCD (Fig. 20C), es posible localizar el FS en el interior celular, aunque en menor cantidad que en las células tratadas solo con ZnPc.

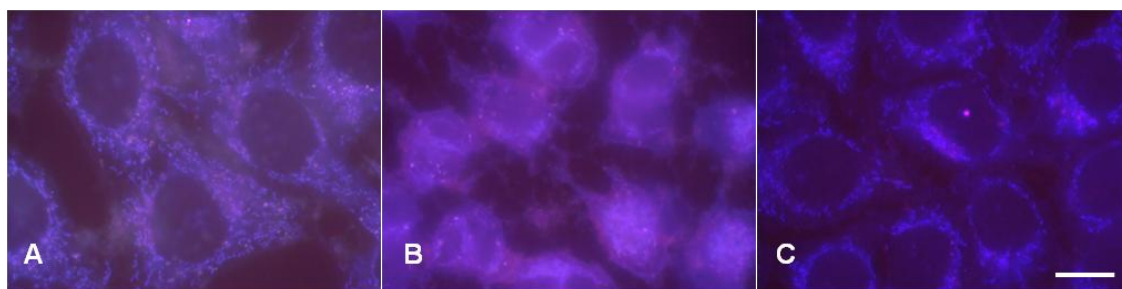


Figura 20. Células HeLa observadas en microscopia de fluorescencia (UV), sin ningún procesamiento. **A:** células incubadas con Gen 1 h más 24 h con ZnPc-DMF+Gen. **B:** incubadas 1 h con CD más 24 h con ZnPc-DMF+CD. **C:** células incubadas con MβCD 1 h más 24 h con ZnPc-DMF+ MβCD. Barra de escala: 20 μm.

2.5. Discusión

El estudio de los mecanismos de internalización de drogas con potencial terapéutico resulta de gran importancia para mejorar la eficacia y especificidad de los tratamientos (Bareford y Swaan, 2007). Se considera que la mayoría de los compuestos de tamaño nanomolecular, penetran en las células por un proceso de tipo endocítico, aunque en la mayoría de los casos el mecanismo preciso por el que se produce esta entrada no se conoce. Esto ha llevado a que en los últimos años, numerosos trabajos hayan tratado de determinar la ruta de internalización de moléculas de diversa naturaleza, tales como drogas terapéuticas, nanopartículas, vectores o incluso microorganismos (Arsianti y col, 2010; Heikkila y col, 2010; Hsu y col, 2012; Zhang y col, 2012).

Conocer el mecanismo de penetración de una sustancia en el interior celular es importante para la aplicación biomédica del compuesto, ya que la identificación de la vía de entrada de un fármaco puede ayudar a predecir su localización intracelular y a entender mejor como actúa, además de permitir un control más preciso de la dosis aplicada (Bareford y Swaan, 2007). Este conocimiento nos puede permite dirigir el compuesto hacia los lisosomas, en el caso de tratamientos que requieren de un entorno ácido para activarse, como ocurre con el fotosensibilizante triacetoximetil éster de clorina e6 (Kessel y Poretz, 2000) o con los tratamientos de enfermedades asociadas a los lisosomas (Bareford y Swaan, 2007). Por otro lado se puede evitar la ruta degradativa de los lisosomas, dirigiendo los compuestos hacia otros orgánulos tales como el aparato de Golgi o el retículo endoplasmático, lo que requiere su entrada mediante endocitosis mediada por caveolina. Esta es la ruta más adecuada para aquellos compuestos sensibles a la acción enzimática de los lisosomas (Jones y col, 2007).

En el campo de la TFD, es especialmente importante conocer la localización del FS, puesto que existe una relación directa entre localización subcelular y efecto fotodinámico, debido a la corta vida media del $^1\text{O}_2$ y su escasa capacidad de difusión. (Moan y Berg, 1991). Por lo tanto, en función del mecanismo de internalización puede variar la localización subcelular del FS, lo

que determina la diana primaria de la TFD (Villanueva y col, 2003; Cañete y col, 2009).

Sin embargo, el estudio de los mecanismos de internalización es complejo debido a la gran cantidad de variables que afectan a la endocitosis. Factores tales como la naturaleza química del compuesto, su mecanismo de vehiculización o la línea celular, pueden influir en el proceso de endocitosis (Hillaireau y Couvreur 2009; McMahon y Boucrot 2011).

En este trabajo hemos estudiado la influencia del vehículo y de la línea celular, en la internalización del fotosensibilizante ZnPc. Este FS se ha administrado a las células en dos condiciones experimentales distintas, disuelto en DMF o incluido en liposomas, utilizando como material experimental dos líneas celulares diferentes, A-549 y HeLa. Para caracterizar los procesos de endocitosis que se producen en las distintas condiciones experimentales, hemos utilizado distintos inhibidores de los mecanismos endocíticos, y se ha valorado el efecto que éstos producían en la supervivencia celular, en la morfología nuclear y en la localización intracelular del FS, comparando los resultados con los obtenidos utilizando las mismas condiciones experimentales en ausencia de los inhibidores.

Los inhibidores de la endocitosis son moléculas de distinta naturaleza, capaces de interferir con diversos elementos de la maquinaria endocítica, bloqueando de forma específica una o más de estas vías. Sin embargo, a la hora de utilizarlos es necesario tener en cuenta una serie de variables. Por un lado, algunos de los inhibidores, deben administrarse en ausencia de suero, puesto que éste bloquea su efecto (Kirchhausen y col, 2008), por lo que hay que evaluar previamente que efecto tiene dicha privación de suero sobre la viabilidad celular. Por otra parte, bajo determinadas condiciones experimentales algunos de los inhibidores, producen cierta toxicidad (Vercauteren y col, 2010), por lo que hay que diseñar los protocolos experimentales teniendo en cuenta este hecho. Además, está descrito que cuando una ruta endocítica se inhibe, las células pueden reaccionar activando otras rutas endocíticas alternativas, especialmente cuando los tratamientos son prolongados (Harush-Frenkel y col, 2007). Por tanto, los

resultados experimentales parciales no son decisivos a la hora de extraer conclusiones, siendo necesaria una valoración global para poder interpretar los resultados.

2.5.1. Dynasore (Dyn)

El Dyn es una pequeña molécula que interfiere con la actividad de la dinamina (Macia y col, 2006; Kirchhausen y col, 2008), una GTPasa implicada en diversos procesos endocíticos, tales como la endocitosis mediada por clatrina y endocitosis dependiente de caveolinas (Henley y col, 1998; Kumari y col, 2010), así como en algunos tipos de endocitosis independiente de ambas (Sandvig y col, 2011). Al bloquear la actividad de la dinamina, el Dyn inhibe todas las vías endocíticas que dependen de esta molécula, quedando las vesículas unidas a la membrana sin poder liberarse al citoplasma. El Dyn solo actúa sobre la dinamina 1, dinamina 2 y la dinamina mitocondrial (Drp 1) (Macia y col, 2006), pero no sobre otras GTPasas, lo que le convierte en una herramienta bastante específica para el estudio de la endocitosis.

En **células A-549**, pudimos comprobar que el Dyn (80 μ M) inhibe significativamente la entrada de la ZnPc-lip, cuando se incubaba con el FS durante 1 o 3 h, pero no resulta eficaz con incubaciones de 24 h, que presentan la misma inactivación fotodinámica en presencia o en ausencia del inhibidor. El análisis de la morfología nuclear de las células tratadas con el FS en presencia de Dyn, nos indica que la muerte que se produce tras 3 h de incubación no es la misma que en ausencia del inhibidor. En presencia del inhibidor, se pueden observar algunas células vivas, aunque la densidad celular es menor y es posible encontrar núcleos con morfología apoptótica, lo que se corresponde más con las morfologías que ocasiona el Dyn solo, que con la necrosis regulada que se produce con los tratamientos fotodinámicos en ausencia del inhibidor. Pensamos que en este caso la letalidad se produce por un efecto sumatorio de la toxicidad del Dyn y de la toxicidad del FS, que aunque en menor cantidad, puede penetrar en las células, como confirman las observaciones en microscopía de fluorescencia. En el caso de las incubaciones con el FS en presencia de Dyn durante 24 horas, la morfología que se obtiene es claramente necrótica, lo que indica que también aquí se

sumaría el efecto del Dyn con el daño que produce el FS, que se puede detectar también en el interior celular.

Cuando se realizaron los tratamientos con ZnPc-DMF en presencia de Dyn, se observaba una inhibición significativa del efecto fotodinámico, encontrándose abundantes células vivas, aunque también podían observarse numerosos núcleos apoptóticos, de forma análoga a la descrita en tratamientos solo con Dyn. El descenso de la supervivencia podría deberse de nuevo al efecto sumatorio de la toxicidad del inhibidor y la ZnPc, sin descartar que la droga acumulada en el exterior celular formando agregados, pueda fotoinactivar las células desde el exterior, ya que no es posible detectar la fluorescencia de la ZnPc en el interior celular, pero si agregados de la droga en la membrana plasmática de las células.

En **células HeLa**, el Dyn utilizado a una concentración 80 μ M, como en el caso anterior, provocaba una elevada toxicidad tanto con 4 h como con 25 h de incubación, lo que impedía utilizar esas condiciones experimentales, por lo que su concentración se redujo a la mitad (40 μ M). Está descrito que a esta concentración, el Dyn es capaz de inhibir la actividad GTPasa de la dinamina de forma eficaz (Macia y col, 2006). Bajo estas condiciones experimentales, la supervivencia y morfología de las células HeLa incubadas con Dyn 2 y 4 h, eran prácticamente igual a la de los controles, mientras que con 25 h de incubación, se observaba un descenso de la viabilidad del 30%, encontrándose en los preparados algunas células apoptóticas. Al igual que en células A-549, pudimos comprobar que el Dyn era también capaz de inhibir la entrada de ZnPc-lip, aunque dicha inhibición es más eficaz con tiempos cortos de incubación. Con 1 h de incubación, la fototoxicidad de la ZnPc-lip en presencia de Dyn era solo de un 25%, presentando las células una morfología normal, aunque era posible encontrar algunos núcleos apoptóticos. Sin embargo, con 3 h de incubación las células tratadas con ZnPc-lip+Dyn sufrían un descenso de la viabilidad de un 75% aproximadamente, presentando una morfología principalmente necrótica. Al igual que en células A-549, este descenso de la supervivencia puede deberse al efecto sumatorio de la toxicidad de FS y del inhibidor. Con 24 h de incubación, las células tratadas con ZnPc-lip en presencia de Dyn sufrían una inactivación del 100%,

presentando una morfología mayoritariamente necrótica. En cuanto a la localización subcelular, con 3 y 24 h de incubación se podía localizar el FS en el interior celular, aunque la intensidad de la fluorescencia era menor que cuando las incubaciones se realizaban en ausencia del inhibidor. Con 24 h de incubación, además podía observarse cierta cantidad de FS adherido a la membrana plasmática, lo que podría explicar el distinto tipo de muerte celular que se detecta en las tinciones con H-33258.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los experimentos con ZnPc-DMF en presencia de Dyn, también eran similares a los obtenidos en las células A-549. Las células HeLa tratadas con ZnPc-DMF durante 24 h en presencia del Dyn, mantenían una supervivencia del 40%. A nivel morfológico, las células presentaban distintas morfologías nucleares, observándose colonias dispersas de células vivas, rodeadas de células necróticas y apoptóticas.

El conjunto de estos resultados apoyan que el Dyn inhibe la entrada de la ZnPc incluida en ambos vehículos, tanto en células A-549 como en células HeLa, pero el inhibidor pierde eficacia conforme se aumenta el tiempo de incubación con la droga. Por tanto, en todos los casos, el mecanismo de internalización sería dependiente de dinamina, lo que descartaría la macropinocitosis.

2.5.2. Citocalasina (CD)

La CD es un compuesto de origen fúngico, permeable a las células, que altera los filamentos de actina impidiendo el ensamblaje de los mismos, inhibiendo su actividad dinámica y ocasionando finalmente su desorganización. Dado que la actina interviene en diversos procesos endocíticos, la CD actúa como inhibidor de las vías dependientes de actina, tales como la macropinocitosis (Conner and Schmid, 2003), donde la polimerización de la actina es necesaria para dirigir la formación de la protrusión de la membrana, cuyo frente se volverá a fusionar con la misma, formando el macropinosoma (Amyere y col, 2002). Por otro lado, se sabe que la actina también está implicada en la endocitosis mediada por caveolina, formando unos parches asociados a las invaginaciones de las caveolas, que se pueden observar en microscopía electrónica (Parton y col, 1994). Por lo tanto, dada la participación de los

microfilamentos de actina en este proceso endocítico, la CD puede impedir la internalización de las caveolas (Fittipaldi y col, 2003; Zhang y col, 2009). Respecto a la endocitosis mediada por clatrina, está descrito que en levaduras se produce la polimerización de la actina previamente a la invaginación inicial de la membrana, lo que indica que este proceso es necesario para la formación del endosoma (Kaksonen y col, 2003). Sin embargo, en mamíferos la polimerización de la actina es un proceso tardío, que ocurre después de la escisión de la vesícula de clatrina y por lo tanto, no influye en la internalización de las vesículas, aunque puede estar relacionada con el tráfico de las mismas en el interior celular (Merrifield y col, 2005). Diversos estudios han confirmado que la CD y otros inhibidores de los microfilamentos de actina no son capaces de inhibir este proceso endocítico en células de mamífero (Fujimoto y col, 2000), lo que indica que en este caso, la polimerización de la actina no es imprescindible para la endocitosis dependiente de clatrina.

En nuestras condiciones experimentales, observamos que las células tratadas con CD sufrían una binucleación proporcional al tiempo de incubación, si bien la morfología nuclear se mantenía bien conservada. Dado que los ensayos de supervivencia mostraban un descenso de la viabilidad, realizamos una serie de pruebas complementarias en las células A-549, para evaluar los efectos secundarios inducidos por la CD y que influencia podían tener sobre nuestros resultados.

El procesamiento de las células con TRITC-faloidina mostró que las células tratadas con CD, tanto 2 como 25 h, y procesadas inmediatamente después de las incubaciones, presentaban una clara desorganización de los filamentos de actina, por lo que la morfología celular resultaba muy alterada, adquiriendo las células un aspecto estrellado. Sin embargo esta alteración es reversible a ambos tiempos, y las células se recuperan a las pocas horas de retirar el inhibidor, no observándose células muertas ni en suspensión, por lo que el descenso de la viabilidad celular antes descrito podría deberse a una parada en el ciclo celular, ocasionada por la CD.

Se cuantificó el número de células binucleadas y el índice mitótico, en células incubadas 2 o 25 h con CD, mediante recuentos a distintos tiempos después de los tratamientos. Estos recuentos confirmaron que la presencia de CD inducía una binucleación generalizada de los cultivos, proporcional al tiempo de incubación con el inhibidor. Esto se debe a que la CD es también un inhibidor de la citocinesis, ya que la alteración de los microfilamentos de actina impide que se forme correctamente el anillo contráctil encargado de dividir la célula en dos (Haraguchi y col, 1997; O'Connell y col, 2001).

Además, la evaluación del índice mitótico de las células tratadas con CD, permitió observar que éste se reducía en su presencia, siendo esta reducción proporcional al tiempo de incubación, ya que está descrito que este compuesto es capaz de detener el ciclo celular, en el paso de la fase G1 a S del ciclo celular (Rubtsova y col, 1998).

Por tanto, en lo referente a los objetivos de nuestro trabajo, podemos afirmar que los tratamientos con CD, tanto con 2 como con 25 h de incubación, no inactivan los cultivos celulares y que la reducción en la supervivencia se debe probablemente a una parada del ciclo celular, que provoca que en las muestras tratadas con CD, el número de células sea menor respecto a los controles.

Por otra parte, el efecto inhibidor de la CD en nuestras condiciones experimentales, se pudo comprobar en experimentos paralelos realizados por nuestro grupo de investigación, en los que se estudió el mecanismo de internalización de nanopartículas de magnetita recubiertas de dextrano aminado (NPs-AD) en células A-549 (Cañete y col, 2010). En ausencia de CD, estas NPs-AD son capaces de incorporarse a la célula, distribuyéndose de forma homogénea por el citoplasma y formando agregados de tamaño variable (Fig. 21A). Sin embargo, la presencia de la CD inhibía su internalización, observándose las NPs-AD sobre la membrana plasmática (Fig. 21B). Por tanto, la CD a una concentración de 5 µg/ml es capaz de inhibir los procesos endocíticos en los que el citoesqueleto de actina está implicado.

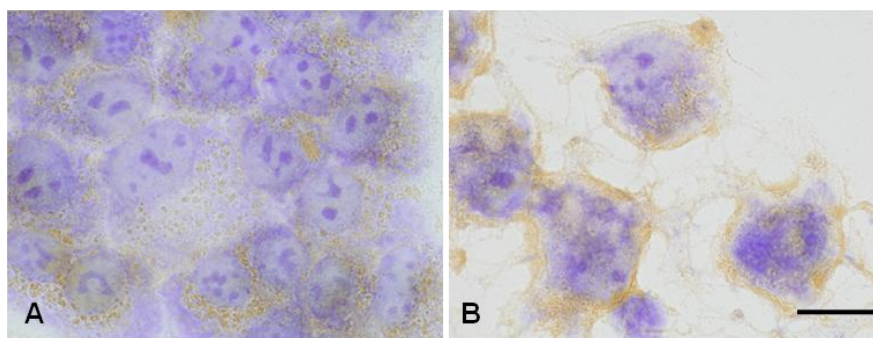


Figura 21. Células A-549 teñidas con azul de toluidina inmediatamente después de los tratamientos. **A:** células incubadas 24 h con NPs-AD, a una concentración 0,1 mg/ml. **B:** células incubadas 24 h con NPs-AD (0,1 mg/ml) en presencia de CD (5 µg/ml). Barra de escala: 20 µm.

En las **células A-549**, la presencia de CD no altera el efecto fotodinámico de la ZnPc-lip, aunque modifica el tipo de muerte celular, que en este caso es claramente necrótico con todos los tiempos de incubación. Probablemente estos cambios en la morfología nuclear, con respecto a la necrosis regulada que se observa después de los tratamientos en ausencia de inhibidor, se deban a una localización distinta del FS, que aunque es capaz de penetrar en las células en presencia del inhibidor, como se observa en microscopia de fluorescencia, no puede seguir un tráfico intracelular normal, debido a la alteración de los microfilamentos de actina. Por el contrario en el caso de la ZnPc-DMF, la actina inhibe significativamente el efecto fotodinámico del FS, tanto con 3 como con 24 h de incubación, obteniéndose la misma morfología nuclear que cuando se incuban las células con el inhibidor solo en ausencia de ZnPc. Además, después de 24 de incubación en presencia de CD, no es posible detectar la fluorescencia del FS en el interior celular.

Las **células HeLa** incubadas en presencia de ZnPc-lip+CD, presentaban una supervivencia idéntica a la obtenida con los tratamientos en ausencia de inhibidores. En las células sometidas a tratamientos fotodinámicos de 3 h de incubación con el FS en presencia del inhibidor, se observa un cambio en el mecanismo de muerte, que pasa a ser principalmente necrótico, aunque las células tratadas con ZnPc-lip+CD durante 24 h y posteriormente irradiadas, vuelven a presentar la morfología propia de la necrosis regulada producida

por los tratamientos en ausencia de CD, lo que constituye una respuesta diferencial respecto a las células A-549.

Por otra parte, la CD no inhibe la internalización de la ZnPc-DMF, por lo que en presencia de este inhibidor se produce una inactivación total de los cultivos, idéntica a la que se origina en los tratamientos fotodinámicos en ausencia de inhibidores, presentando las células morfologías nucleares equivalentes. Tampoco se observaban variaciones en la localización subcelular del FS.

De estos resultados se deduce que la CD no inhibe la endocitosis de la ZnPc-lip en ambos tipos celulares, lo que descartaría la macropinocitosis y la endocitosis mediada por caveolinas como mecanismo de internalización. En el caso del FS disuelto en DMF, la CD solo afecta su internalización en células A-549, que probablemente sería a través de un mecanismo endocítico dependiente de caveolinas.

2.5.3. Genisteina (Gen)

La Gen es un compuesto de la familia de las isoflavonas, que actúa como inhibidor de las tirosina-kinasas implicadas en la endocitosis mediada por caveolina (Vercauteren y col, 2010). Durante la endocitosis mediada por caveolina, ante la presencia de determinados ligandos, se produce una activación de tirosina-kinasas de la familia Src, las cuales fosforilan cav-1, que induce una cascada de señales que resultan en la internalización del ligando (Damm y col, 2005). La Gen, al inhibir estas tirosina-kinasas, bloquea la endocitosis mediada por caveolinas.

Las **células A-549** incubadas con ZnPc-lip, durante 1, 3 y 24 h en presencia de Gen, no presentaba diferencias en la supervivencia, morfología o localización, con respecto al tratamiento con el FS en ausencia de inhibidores.

En el caso de los tratamientos con ZnPc-DMF en presencia de Gen, se observaba una reducción del efecto fotodinámico del FS y una morfología celular equivalente a la descrita para los tratamientos solo con el inhibidor. Tampoco era posible localizar el FS mediante microscopía de fluorescencia, pero si en campo claro, donde se observaban acúmulos de ZnPc adheridos a la membrana plasmática.

Las **células HeLa** sometidas a tratamientos fotodinámicos con ZnPc-lip en presencia de Gen, tampoco mostraban diferencias ni en la supervivencia celular, ni el mecanismo de muerte, ni en la localización subcelular, con respecto a los mismos tratamientos realizados en ausencia del inhibidor.

Los tratamientos fotodinámicos llevados a cabo con ZnPc-DMF en presencia de Gen, mostraron que no había inhibición de la internalización del FS, produciéndose una inactivación total de los cultivos. Además, la localización del FS y la morfología nuclear después de los tratamientos, eran equiparables a los obtenidos con los mismos tratamientos fotodinámicos en ausencia de este inhibidor.

Del conjunto de estos resultados se desprende, que la ZnPc-lip no penetra en ninguna de las dos líneas celulares por un mecanismo dependiente de caveolina, pero cuando la droga se vehiculiza en DMF, aparecen diferencias según la línea celular, de manera que en células A-549, los resultados indican que el FS se internaliza mediante endocitosis dependiente de caveolina, mientras que no lo hace por este mecanismo en el caso de las células HeLa. Todos estos resultados confirman los obtenidos anteriormente con la CD.

2.5.4. Metil- β -ciclodextrina (M β CD)

La M β CD es un oligosacárido cíclico, que posee la capacidad de extraer el colesterol de las células en cultivo (Li y col, 2008). El colesterol es el principal componente de las "balsas lipídicas", implicadas en diversos mecanismos de internalización independientes de caveolina y clatrina. Se ha visto que en células en las que la endocitosis mediada por clatrina y caveolina está bloqueada, se producen procesos de endocitosis dependientes de colesterol e independientes de dinamina y por tanto de clatrina y caveolina. Este es el caso de la internalización del virus SV40 en células KO para cav-1 (Damm y col, 2005). Por tanto, al extraer el colesterol, se inhiben las vías endocíticas asociadas a balsas lipídicas.

En **células A-549**, la M β CD no inhibe la entrada del fotosensibilizante, ni altera su localización subcelular, en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, tanto si administrábamos la droga incluida en liposomas, como disuelta en DMF.

En **células HeLa**, la M β CD tampoco altera la entrada del FS cuando se administra incluido en liposomas, pero el efecto de la ZnPc diluida en DMF se inhibe significativamente. La inactivación celular es de un 60%, frente al 90% que se produce en ausencia del inhibidor. Además, aunque con menor intensidad, se puede detectar la fluorescencia roja del FS en el interior celular.

Por lo tanto, en las células A-549, no parece que haya internalización del FS por mecanismos endocíticos dependientes de balsas lipídicas, mientras en las células HeLa este mecanismo endocítico parece contribuir a la internalización de ZnPc cuando se administra disuelta en DMF.

2.6. Conclusiones

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que el mecanismo de internalización de un compuesto, en este caso un fotosensibilizante, puede variar en función tanto de su sistema de vehiculización, como de la línea celular a la que se aplique.

La ZnPc incluida en liposomas penetra en las dos líneas celulares estudiadas, por un mecanismo dependiente de clatrina, mientras que el FS vehiculado en DMF, penetra por mecanismos distintos en función del tipo celular, siendo dependiente de caveolina en células A-549, e independiente de clatrina y caveolina en células HeLa.

Cabe destacar que este trabajo es el primero de estas características realizado en el área de la terapia fotodinámica y los resultados obtenidos aportan un mejor conocimiento de los mecanismos de internalización de los agentes fotosensibilizantes, pudiendo servir como base para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan aumentar y/o modular la eficacia de los tratamientos.

En distintos tipos de terapias y especialmente en oncología, se requiere un elevado grado de especificidad para optimizar los resultados y personalizar los protocolos. En este sentido es de gran interés conocer el mecanismo de internalización de una droga, lo que puede permitir un mejor conocimiento de su acción terapéutica y el diseño de protocolos mejor dirigidos al objetivo que se quiere lograr.

Bibliografía

- **Aghamohammadzadeh S**, Ayscough KR (2009) *Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis*. Nat Cell Biol 11:1039-1042
- **Amyere M**, Mettlen M, Smisgen PVD, Platek A, Payrastre B, Veithen A, Courtoy PJ (2002) *Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis*. Int J Med Microbiol 291:487-494
- **Anderson RG**, Brown MS, Goldstein JL (1977) *Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts*. Cell 10:351-364
- **Aoki T**, Nomura R, Fujimoto T (1999) *Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium*. Exp Cell Res 253:629-636
- **Arsianti M**, Lim M, Marquis CP, Amal R (2010) *Polyethylenimine based magnetic iron-oxide vector: the effect of vector component assembly on cellular entry mechanism, intracellular -localization, and cellular viability*. Biomacromolecules 11:2521-2531
- **Bareford LM**, Swaan PW (2007) *Endocytic mechanisms for targeted drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev 59:748-758
- **Boucrot E**, Saffarian S, Massol R, Kirchhausen T, Ehrlich M (2006) *Role of lipids and actin in the formation of clathrin-coated pits*. Exp Cell Res 312:4036-4048
- **Bretscher MS**, Thomson JN, Pearse BM (1980) *Coated pits act as molecular filters*. Proc Natl Acad Sci U S A 77:4156-4159
- **Breuza L**, Corby S, Arsanto JP, Delgrossi MH, Scheiffele P, Bivic AL (2002) *The scaffolding domain of caveolin 2 is responsible for its Golgi localization in Caco-2 cells*. J Cell Sci 115:4457-4467
- **Briand N**, Dugail I, Lay SL (2011) *Cavin proteins: New players in the caveolae field*. Biochimie 93:71-77
- **Caballero A**, Katkere B, Wen XY, Drake L, Nashar TO, Drake JR (2006) *Functional and structural requirements for the internalization of distinct BCR-ligand complexes*. Eur J Immunol 36:3131-3145
- **Cañete M**, Stockert JC, Villanueva A (2009) *Preclinical photodynamic therapy research in Spain. 3. Localization of photosensitizers and mechanisms of cell death in vitro*. J Porphyr Phthalocyanines 13:544-551
- **Cañete M**, Soriano J, Villanueva A, Roca AG, Veintemillas S, Serna CJ, Miranda R, Morales MP (2010) *The endocytic penetration mechanism of iron oxide magnetic nanoparticles with positively charged cover: A morphological approach*. Int J Mol Med 26:533-539
- **Chavanpatil MD**, Khdair A, Panyam J (2006) *Nanoparticles for cellular drug delivery: mechanisms and factors influencing delivery*. J Nanosci Nanotechnol 6:2651-2663

- **Cheng Y**, Boll W, Kirchhausen T, Harrison SC, Walz T (2007) *Cryo-electron tomography of -clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly*. J Mol Biol 365:892-899
- **Chithrani BD**, Ghazani AA, Chan WCW (2006) *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. Nano Lett 6:662-668
- **Conner SD**, Schmid SL (2003) *Regulated portals of entry into the cell*. Nature 422:37-44
- **Consortium IT**, Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L (2010) *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov 9:215-236
- **Cureton DK**, Massol RH, Saffarian S, Kirchhausen TL, Whelan SPJ (2009) *Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization*. PLoS Pathog 5:e1000394
- **Damm EM**, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A (2005) *Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae*. J Cell Biol 168:477-488
- **Danino D**, Moon KH, Hinshaw JE (2004) *Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin*. J Struct Biol 147:259-267
- **Dauty E**, Remy JS, Zuber G, Behr JP (2002) *Intracellular delivery of nanometric DNA particles via the folate receptor*. Bioconjug Chem 13:831-839
- **Dietzen DJ**, Hastings WR, Lublin DM (1995) *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae*. J Biol Chem 270:6838-6842
- **Dittman JS**, Kaplan JM (2006) *Factors regulating the abundance and localization of synaptobrevin in the plasma membrane*. Proc Natl Acad Sci USA 103:11399-11404
- **Doherty GJ**, McMahon HT (2009) *Mechanisms of endocytosis*. Annu Rev Biochem 78:857-902
- **Donaldson JG**, Porat-Shliom N, Cohen LA (2009) *Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling*. Cell Signal 21:1-6
- **Dong M**, Richards DA, Goodnough MC, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER (2003) *Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells*. J Cell Biol 162:1293-1303
- **Ehrlich M**, Boll W, Oijen AV, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, Kirchhausen T (2004) *Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits*. Cell 118:591-605

- **Eto DS**, Gordon HB, Dhakal BK, Jones TA, Mulvey MA (2008) *Clathrin, AP-2, and the NPXY-binding subset of alternate endocytic adaptors facilitate FimH-mediated bacterial invasion of host cells*. Cell Microbiol 10:2553-2567
- **Ferguson SM**, Camilli PD (2012) *Dynamin, a membrane-remodelling GTPase*. Nat Rev Mol Cell Biol 13:75-88
- **Fielding PE**, Russel JS, Spencer TA, Hakamata H, Nagao K, Fielding CJ (2002) *Sterol efflux to apolipoprotein A-I originates from caveolin-rich microdomains and potentiates PDGF-dependent protein kinase activity*. Biochemistry 41:4929-4937
- **Fittipaldi A**, Ferrari A, Zoppé M, Arcangeli C, Pellegrini V, Beltram F, Giacca M (2003) *Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins*. J Biol Chem 278:34141-34149
- **Fra AM**, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) *De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin*. Proc Natl Acad Sci USA 92:8655-8659
- **Fujimoto LM**, Roth R, Heuser JE, Schmid SL (2000) *Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells*. Traffic 1:161-171
- **Galbiati F**, Volonte D, Chu JB, Li M, Fine SW, Fu M, Bermudez J, Pedemonte M, Weidenheim KM, Pestell RG, Minetti C, Lisanti MP (2000) *Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A 97:9689-9694
- **García-Díaz M**, Nonell S, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M, Casadó A, Mora M, Sagristá ML (2011) *Do folate-receptor targeted liposomal photosensitizers enhance photodynamic therapy selectivity?* Biochim Biophys Acta 1808:1063-1071
- **Gibert M**, Monier M-N, Ruez R, Hale ML, Stiles BG, Benmerah A, Johannes L, Lamaze C, Popoff MR (2011) *Endocytosis and toxicity of clostridial binary toxins depend on a clathrin-independent pathway regulated by Rho-GDI*. Cell Microbiol 13:154-170
- **Glebov OO**, Bright NA, Nichols BJ (2006) *Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells*. Nat Cell Biol 8:46-54
- **Grant BD**, Donaldson JG (2009) *Pathways and mechanisms of endocytic recycling*. Nat Rev Mol Cell Biol 10:597-608
- **Grafton SEA**, Napier ME, Ropp PA, Tian S, DeSimone JM (2008a) *Microfabricated particles for engineered drug therapies: elucidation into the mechanisms of cellular internalization of PRINT particles*. Pharm Res 25:2845-2852
- **Grafton SEA**, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM (2008b) *The effect of particle design on cellular internalization pathways*. Proc Natl Acad Sci USA 105:11613-11618

- **Haraguchi T**, Kaneda T, Hiraoka Y (1997) *Dynamics of chromosomes and microtubules visualized by multiple-wavelength fluorescence imaging in living mammalian cells: effects of mitotic inhibitors on cell cycle progression*. Genes Cells 2: 369-380
- **Harris J**, Werling D, Hope JC, Taylor G, Howard CJ (2002) *Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions*. Trends Immunol 23:158-164
- **Harush-Frenkel O**, Debotton N, Benita S, Altschuler Y (2007) *Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway*. Biochem Biophys Res Commun 353:26-32
- **Haucke V**, Camilli PD (1999) *AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs*. Science 285:1268-1271
- **Haucke V**, Neher E, Sigrist SJ (2011) *Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis*. Nat Rev Neurosci 12:127-138
- **Hayer A**, Stoeber M, Bissig C, Helenius A (2010) *Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes*. Traffic 11:361-382
- **Heikkila O**, Susi P, Tevaluoto T, Harma H, Marjomaki V, Hyypia T, Kiljunen S (2010) *Internalization of Coxsackievirus A9 is mediated by beta 2-microglobulin, Dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin*. J Virol 84:3666-3681
- **Henley JR**, Cao H, McNiven MA (1999) *Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles*. FASEB J 13 Suppl 2:S243-S247
- **Henley JR**, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (1998) *Dynamin-mediated internalization of caveolae*. J Cell Biol 141:85-99
- **Henne WM**, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R, McMahon HT (2010) *FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis*. Science 328:1281-1284
- **Heuser JE**, Reese TS (1973) *Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction*. J Cell Biol 57:315-344
- **Hewlett LJ**, Prescott AR, Watts C (1994) *The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations*. J Cell Biol 124:689-703
- **Hilgenbrink AR**, Low PS (2005) *Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics*. J Pharm Sci 94:2135-2146
- **Hill MM**, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ, Walser P, Abankwa D, Oorschot VMJ, Martin S, Hancock JF, Parton RG (2008) *PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function*. Cell 132:113-124
- **Hillaireau H**, Couvreur P (2009) *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*. Cell Mol Life Sci 66:2873-2896
- **Hinshaw JE**, Schmid SL (1995) *Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding*. Nature 374:190-192
- **Howes MT**, Mayor S, Parton RG (2010a) *Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis*. Curr Opin Cell Biol 22:519-527

- **Howes MT**, Kirkham M, Riches J, Cortese K, Walser PJ, Simpson F, Hill MM, Jones A, Lundmark R, Lindsay MR, Hernandez-Deviez DJ, Hadzic G, McCluskey A, Bashir R, Liu L, Pilch P, McMahon H, Robinson PJ, Hancock JF, Mayor S, Parton RG (2010b) *Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells*. J Cell Biol 190:675-691
- **Hsu S**, Ho TT, Tseng TC (2012) *Nanoparticle uptake and gene transfer efficiency for MSCs on chitosan and chitosan-hyaluronan substrates*. Biomaterials 33:3639-3650
- **Jones AT** (2007) *Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides*. J Cell Mol Med 11:670-684
- **Jones AT** (2008) *Gateways and tools for drug delivery: endocytic pathways and the cellular dynamics of cell penetrating peptides*. Int J Pharm 354:34-38
- **Kaksonen M**, Sun Y, Drubin DG (2003) *A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization*. Cell 115:475-487
- **Kaksonen M**, Toret CP, Drubin DG (2005) *A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery*. Cell 123:305-320
- **Kerr MC**, Teasdale RD (2009) *Defining macropinocytosis*. Traffic 10:364-371
- **Kessel D**, Poretz RD (2000) *Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME)*. Photochem Photobiol 71:94-96
- **Keyel PA**, Mishra SK, Roth R, Heuser JE, Watkins SC, Traub LM (2006) *A single common portal for clathrin-mediated endocytosis of distinct cargo governed by cargo-selective adaptors*. Mol Biol Cell 17:4300-4317
- **Khalil IA**, Kogure K, Akita H, Harashima H (2006) *Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery*. Pharmacol Rev 58:32-45
- **Kim HR**, Gil S, Andrieux K, Nicolas V, Appel M, Chacun H, Desmaële D, Taran F, Georgin D, Couvreur P (2007) *Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells*. Cell Mol Life Sci 64:356-364
- **Kirchhausen T**, Macia E, Pelish HE (2008) *Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis*. Methods Enzymol 438:77-93
- **Kirkham M**, Parton RG (2005) *Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers*. Biochim Biophys Acta 1745:273-286
- **Kolhatkar R**, Lote A, Khambati H (2011) *Active tumor targeting of nanomaterials using folic acid, transferrin and integrin receptors*. Curr Drug Discov Technol 8:197-206
- **Kreuter J** (2001) *Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs*. Adv Drug Deliv Rev 47:65-81
- **Kumari S**, Mg S, Mayor S (2010) *Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell*. Cell Res 20:256-275

- **Lajoie P**, Nabi IR (2007) *Regulation of raft-dependent endocytosis*. J Cell Mol Med 11:644-653
- **Lajoie P**, Nabi IR (2010) *Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis*. Int Rev Cell Mol Biol 282:135-163
- **Lamaze C**, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A (2001) *Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway*. Mol Cell 7:661-671
- **Lan TH**, Kuravi S, Lambert NA (2011) *Internalization dissociates β 2-adrenergic receptors*. PLoS One 6:e17361
- **Lee ES**, Na K, Bae YH (2005) *Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor*. J Control Release 103:405-418
- **Lewin M**, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, Weissleder R (2000) *Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells*. Nat Biotechnol 18:410-414
- **Lewis WH** (1931) *Pinocytosis*. Johns Hopkins Hosp Bull. 49:17-27.
- **Li W**, Chen C, Ye C, Wei T, Zhao Y, Lao F, Chen Z, Meng H, Gao Y, Yuan H, Xing G, Zhao F, Chai Z, Zhang X, Yang F, Han D, Tang X, Zhang Y (2008) *The translocation of fullerene nanoparticles into lysosome via the pathway of clathrin-mediated endocytosis*. Nanotechnology 19:145102
- **Lim JP**, Gleeson PA (2011) *Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps*. Immunol Cell Biol 89:836-43
- **Liu L**, Pilch PF (2008) *A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization*. J Biol Chem 283:4314-4322
- **Low PS**, Kularatne SA (2009) *Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer*. Curr Opin Chem Biol 13:256-262
- **Lu Y**, Low PS (2002) *Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents*. Adv Drug Deliv Rev 54:675-693
- **Lühmann T**, Rimann M, Bittermann AG, Hall H (2008) *Cellular uptake and intracellular pathways of PLL-g-PEG-DNA nanoparticles*. Bioconj Chem 19:1907-1916
- **Macia E**, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T (2006) *Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin*. Dev Cell 10:839-850
- **Mao S**, Germershaus O, Fischer D, Linn T, Schnepf R, Kissel T (2005) *Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nanocomplexes by epithelial cells*. Pharm Res 22:2058-2068
- **McMahon HT**, Boucrot E (2011) *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol 12:517-533

- **McMahon KA**, Zajicek H, Li WP, Peyton MJ, Minna JD, Hernandez VJ, Luby-Phelps K, Anderson RGW (2009) *SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function*. EMBO J 28:1001-1015
- **Merrifield CJ**, Perrais D, Zenisek D (2005) *Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells*. Cell 121:593-606
- **Mettlen M**, Loerke D, Yarar D, Danuser G, Schmid SL (2010) *Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis*. J Cell Biol 188:919-933
- **Moan J**, Berg K (1991) *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen*. Photochem Photobiol 53:549-553.
- **Moreno-Ruiz E**, Galán-Díez M, Zhu W, Fernández-Ruiz E, d'Enfert C, Filler SG, Cossart P, Veiga E (2009) *Candida albicans internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism*. Cell Microbiol 11:1179-1189
- **Motley A**, Bright NA, Seaman MNJ, Robinson MS (2003) *Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells*. J Cell Biol 162:909-918
- **Muro S**, Garnacho C, Champion JA, Leferovich J, Gajewski C, Schuchman EH, Mitragotri S, Muzykantov VR (2008) *Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers*. Mol Ther 16:1450-1458
- **Nabi IR**, Le PU (2003) *Caveolae/raft-dependent endocytosis*. J Cell Biol 161:673-677
- **Nankoe SR**, Sever S (2006) *Dynasore puts a new spin on dynamin: a surprising dual role during vesicle formation*. Trends Cell Biol 16:607-609
- **Nichols B** (2003) *Caveosomes and endocytosis of lipid rafts*. J Cell Sci 116:4707-4714
- **Nonet ML**, Holgado AM, Brewer F, Serpe CJ, Norbeck BA, Holleran J, Wei L, Hartwig E, Jorgensen EM, Alfonso A (1999) *UNC-11, a Caenorhabditis elegans AP180 homologue, regulates the size and protein composition of synaptic vesicles*. Mol Biol Cell 10:2343-2360
- **O'Connell CB**, Warner AK, Wang Y-L (2001) *Distinct roles of the equatorial and polar cortices in the cleavage of adherent cells*. Curr Biol 11: 702-707
- **Palade G** (1953) *Fine structure of blood capillaries*. J Appl Phys 24, 1424
- **Parton RG**, Hanzal-Bayer M, Hancock JF (2006) *Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation*. J Cell Sci 119:787-796
- **Parton RG**, Joggerst B, Simons K (1994) *Regulated internalization of caveolae*. J Cell Biol 127:1199-1215
- **Parton RG**, del Pozo MA (2013) *Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers*. Nat Rev Mol Cell Biol 14:98-112

- **Parton RG**, Richards AA (2003) *Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms*. Traffic 4:724-738
- **Parton RG**, Simons K (2007) *The multiple faces of caveolae*. Nat Rev Mol Cell Biol 8:185-194
- **Payne CK**, Jones SA, Chen C, Zhuang X (2007) *Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands*. Traffic 8:389-401
- **Pearse BM** (1982) *Coated vesicles from human placenta carry ferritin, transferrin, and immunoglobulin G*. Proc Natl Acad Sci U S A 79:451-455
- **Pelkmans L**, Kartenbeck J, Helenius A (2001) *Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER*. Nat Cell Biol 3:473-483
- **Peng L**, Berntsson RPA, Tepp WH, Pitkin RM, Johnson EA, Stenmark P, Dong M (2012) *Botulinum neurotoxin D-C uses synaptotagmin I/II as receptors and human synaptotagmin II is not an effective receptor for type B, D-C, and G toxins*. J Cell Sci 125:3233-3242
- **Perret E**, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulán E (2005) *Evolving endosomes: how many varieties and why?* Curr Opin Cell Biol 17:423-434
- **Pol A**, Martin S, Fernández MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, Parton RG (2005) *Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies*. Mol Biol Cell 16:2091-2105
- **Pust S**, Barth H, Sandvig K (2010) *Clostridium botulinum C2 toxin is internalized by clathrin- and Rho-dependent mechanisms*. Cell Microbiol 12:1809-1820
- **Qian ZM**, Li H, Sun H, Ho K (2002) *Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway*. Pharmacol Rev 54:561-587
- **Riento K**, Frick M, Schafer I, Nichols BJ (2009) *Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase*. J Cell Sci 122:912-918
- **de Rooij IIS**, Allwood EG, Aghamohammadzadeh S, Hetteema EH, Goldberg MW, Ayscough KR (2010) *A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast*. J Cell Sci 123:3496-3506
- **Roth TF**, Porter KR (1964) *Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito Aedes aegypti. L*. J Cell Biol 20:313-332
- **Rothberg KG**, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992) *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. Cell 68:673-682
- **Rothnie A**, Clarke AR, Kuzmic P, Cameron A, Smith CJ (2011) *A sequential mechanism for clathrin cage disassembly by 70-kDa heat-shock cognate protein (Hsc70) and auxilin*. Proc Natl Acad Sci USA 108:6927-6932

- **Rubtsova SN**, Kondratov RV, Kopnin PB, Chumakov PM, Kopnin BP, Vasiliev JM (1998) *Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53*. FEBS Letters 430: 353-57
- **Rust MJ**, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X (2004) *Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry*. Nat Struct Mol Biol 11:567-573
- **Sabharanjak S**, Mayor S (2004) *Folate receptor endocytosis and trafficking*. Adv Drug Deliv Rev 56:1099-1109
- **Saffarian S**, Cocucci E, Kirchhausen T (2009) *Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques*. PLoS Biol 7:e1000191
- **Sahoo SK**, Labhasetwar V (2005) *Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention*. Mol Pharm 2:373-383
- **Sandvig K**, Pust S, Skotland T, van Deurs B (2011) *Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function*. Curr Opin Cell Biol 23:413-420
- **Sandvig K**, Torgersen ML, Raa HA, van Deurs B (2008) *Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity*. Histochem Cell Biol 129:267-276
- **Schiffelers RM**, Koning GA, ten Hagen TLM, Fens MHAM, Schraa AJ, Janssen APCA, Kok RJ, Molema G, Storm G (2003) *Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin*. J Control Release 91:115-122
- **Schlossman DM**, Schmid SL, Braell WA, Rothman JE (1984) *An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase*. J Cell Biol 99:723-733
- **Schmid EM**, Ford MGJ, Burtay A, Praefcke GJK, Peak-Chew S-Y, Mills IG, Benmerah A, McMahon HT (2006) *Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly*. PLoS Biol 4:e262
- **Schnatwinkel C**, Christoforidis S, Lindsay MR, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Parton RG, Zerial M (2004) *The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms*. PLoS Biol 2:E261
- **Scita G**, Fiore PPD (2010) *The endocytic matrix*. Nature 463:464-473
- **Sharma DK**, Brown JC, Choudhury A, Peterson TE, Holicky E, Marks DL, Simari R, Parton RG, Pagano RE (2004) *Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol*. Mol Biol Cell 15:3114-3122
- **Sorkin A**, von Zastrow M (2009) *Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks*. Nat Rev Mol Cell Biol 10:609-622
- **Sowa G**, Pypaert M, Fulton D, Sessa WC (2003) *The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation*. Proc Natl Acad Sci U S A 100:6511-6516

- **Stahlhut M**, van Deurs B (2000) *Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton*. Mol Biol Cell 11:325-337
- **Stella B**, Arpicco S, Peracchia MT, Desmaële D, Hoebeke J, Renoir M, D'Angelo J, Cattel L, Couvreur P (2000) *Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting*. J Pharm Sci 89:1452-1464
- **Stimpson HEM**, Toret CP, Cheng AT, Pauly BS, Drubin DG (2009) *Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast*. Mol Biol Cell 20:4640-4651
- **Sugano K**, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, Ecker GF, Faller B, Fischer H, Gerebtzoff G, Lennernaes H, Senner F (2010) *Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport*. Nat Rev Drug Discov 9:597-614
- **Sweitzer SM**, Hinshaw JE (1998) *Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation*. Cell 93:1021-1029
- **Tagawa A**, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Pelkmans L, Helenius A (2005) *Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters*. J Cell Biol 170:769-779
- **Takamori S**, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, Groot BLD, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R (2006) *Molecular anatomy of a trafficking organelle*. Cell 127:831-846
- **Talekar M**, Kendall J, Denny W, Garg S (2011) *Targeting of nanoparticles in cancer: drug delivery and diagnostics*. Anticancer Drugs 22:949-962
- **Thomsen P**, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B (2002) *Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking*. Mol Biol Cell 13:238-250
- **Traub LM** (2009) *Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization*. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 583-596
- **Ungewickell E**, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, Martin B, Greene LE, Eisenberg E (1995) *Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles*. Nature 378:632-635
- **Veiga E**, Guttman JA, Bonazzi M, Boucrot E, Toledo-Arana A, Lin AE, Enninga J, Pizarro-Cerdá J, Finlay BB, Kirchhausen T, Cossart P (2007) *Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection*. Cell Host Microbe 2:340-351
- **Vercauteren D**, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, Smedt SCD, Sanders NN, Braeckmans K (2010) *The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls*. Mol Ther 18:561-569

- **Villanueva A**, Vidania R, Stockert JC, Cañete M, Juarranz A. *Photodynamic effects on cultured tumor cells (2003) Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms*. In: Nalwa HS, editor. *Handbook of Photochemistry and Biology*. Vol 4. California: American Scientific Publishers. p. 79-117.
- **Wadia JS**, Stan RV, Dowdy SF (2004) *Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis*. Nat Med 10:310-315
- **Warren RA**, Green FA, Enns CA (1997) *Saturation of the endocytic pathway for the transferrin receptor does not affect the endocytosis of the epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem 272:2116-2121
- **Warren RA**, Green FA, Stenberg PE, Enns CA (1998) *Distinct saturable pathways for the endocytosis of different tyrosine motifs*. J Biol Chem 273:17056-17063
- **Williams TM**, Lisanti MP (2004) *The caveolin proteins*. Genome Biol 5:214
- **Yu A**, Rual JF, Tamai K, Harada Y, Vidal M, He X, Kirchhausen T (2007) *Association of Dishevelled with the clathrin AP-2 adaptor is required for Frizzled endocytosis and planar cell polarity signaling*. Dev Cell 12:129-141
- **Zauner W**, Farrow NA, Haines AM (2001) *In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density*. J Control Release 71:39-51
- **Zhang LW**, Yang J, Barron AR, Monteiro-Riviere NA (2009) *Endocytic mechanisms and toxicity of a functionalized fullerene in human cells*. Toxicol Lett 191:149-157
- **Zhang Y**, Zhou C, Kwak KJ, Wang X, Yung B, Lee LJ, Wang Y, Wang PG, Lee RJ (2012) *Efficient siRNA delivery using a polyamidoamine dendrimer with a modified pentaerythritol core*. Pharm Res 29:1627-1636

An abstract graphic design featuring three blue circles of varying sizes. Each circle is composed of three concentric layers: a dark blue center, a medium blue middle ring, and a light blue outer ring. Two thin, light blue lines originate from the top left and extend diagonally across the page, passing behind the circles. The circles are positioned in the upper right and lower right areas of the page.

Material y métodos

1. Cultivos celulares

Para los distintos experimentos se usaron dos líneas celulares distintas: A-549, procedentes de un adenocarcinoma pulmonar humano; y células HeLa, que derivan de un carcinoma cérvico-uterino humano.

La línea A-549 fue establecida por Giard y col (1973). Estas células crecen en monocapa adheridas al sustrato y son utilizadas habitualmente como modelo *in vitro* para el estudio de células epiteliales alveolares de tipo II.

En cuanto a las células HeLa, se trata de la primera línea celular establecida de la historia. Iniciada en 1951 por Gey (Scherer y col, 1953), también son el linaje celular más utilizado en investigación *in vitro* y han sido usadas para estudios sobre el cáncer, SIDA, toxicidad, mapeo genético y muchas otras investigaciones científicas.

Ambos tipos celulares se cultivaron en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), un medio de cultivo compuesto por distintos aminoácidos, sales, glucosa y vitaminas. Además contiene rojo fenol como indicador de pH. El DMEM fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v), 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina y L-glutamina 0,2 M al 1% (v/v), todos ellos suministrados por Gibco (UK).

Las células se mantuvieron en un incubador (Steri-Cult 200, Hucoq-Erloss) con un 5% de CO₂ y una temperatura de 37 °C. Para los distintos tratamientos las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Falcon, USA) o de 6 pocillos (Corning, USA), directamente o sobre cubreobjetos. Los experimentos se llevaron a cabo cuando las células estaban en fase exponencial y en un 60-70% de confluencia.

2. ZnPc incluida en liposomas

La ZnPc (Sigma-Aldrich, USA) se disolvió en piridina a una concentración de 0,5 mg/ml. La inclusión de la droga en liposomas se realizó siguiendo el método de inyección de Ginevra y col, 1990: se disolvieron 10,5 mg de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, Sigma-Aldrich) en 1 ml de etanol. Se tomaron 0,735 ml de esta disolución y se mezclaron con 0,265 ml de ZnPc en piridina. De esta mezcla se tomaron 0,8 ml que se inyectaron lentamente en 10 ml de PBS

estéril a una temperatura de 55 °C. Se dejó enfriar la muestra, se introdujo en membranas de diálisis (Medicell International Ltd., UK) y se dializó durante 4 h en PBS para eliminar los restos de piridina. Los liposomas con la ZnPc ya incorporada se filtraron a través de filtros Millipore® (0,22 µM de diámetro) y se diluyeron en DMEM, con o sin SFB, hasta alcanzar la concentración deseada. Los liposomas se utilizaron siempre en las 48 h posteriores a su preparación.

3. ZnPc disuelta en DMF

La ZnPc se disolvió en dimetilformamida (DMF, Panreac, España) a una concentración inicial de $1,19 \times 10^{-3}$ M. Debido a la tendencia del fotosensibilizante a agregarse en DMF, antes de cada experimento esta solución madre se mantuvo sometida a agitación durante 24 h. Para realizar los tratamientos, la solución madre se diluyó en DMEM con o sin SFB, hasta alcanzar la concentración deseada.

4. m-THPPo disuelto en DMSO

El m-THPPo fue sintetizado por el grupo de Dr. Santiago Nonell siguiendo el procedimiento descrito en García-Díaz y col (2011).

El temoceno, se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac, España) a una concentración de 10^{-3} M. Para reducir la agregación del FS, antes de cada experimento esta solución madre se sometió a agitación durante 24 h. Para los tratamientos, el m-THPPo disuelto en DMSO se diluyó en DMEN sin SFB hasta alcanzar la concentración deseada.

5. m-THPPo incluido en liposomas

Los liposomas con el FS incluido fueron sintetizados, caracterizados y liofilizados por el grupo de la Dra. Mora (Soriano y col, 2013).

Inmediatamente antes de los experimentos, los liposomas liofilizados se reconstituyeron añadiendo 2 ml de agua destilada, obteniendo una suspensión que se calentó 15 min a 60 °C y se sometió durante 30 min a ciclos de 30 seg de agitación y 30 seg de calentamiento. Esta suspensión se diluyó en DMEN sin suero hasta una concentración 10 µM de m-THPPo, se filtraron a través de filtros de 0,45 µm (Pall Corporation, USA) y de 0,22 µm (Millipore®), y

se diluyó de nuevo en DMEN sin suero hasta alcanzar la concentración deseada para los experimentos.

6. Localización subcelular

En los estudios de localización celular, las células crecidas sobre cubreobjetos, se incubaron durante 3 o 24 h, con ZnPc incorporada en liposomas o disuelta en DMF (1 μ M en todos los casos). En el caso del *m*-THPPo, las células se incubaron 24 h, con el FS incluido en liposomas (2 o 5 μ M) o disuelto en DMSO (2, 5 o 10 μ M). A continuación, las células se lavaron con PBS tres veces, se montaron en un portaobjetos y se observaron directamente en microscopía de fluorescencia bajo luz de excitación ultravioleta.

7. Tinción de mitocondrias in vivo con Mitotracker® Green

Se estudió la posible localización mitocondrial del *m*-THPPo-DMSO mediante el uso de la sonda Mitotracker® Green (Invitrogen, UK), que permite teñir *in vivo* estos orgánulos. Esta sonda es capaz de difundir pasivamente a través de la membrana plasmática y acumularse en las mitocondrias, gracias a su afinidad por los grupos tiol presentes en este orgánulo. Este tipo de unión mantiene el fluorocromo unido a las mitocondrias, aunque se fijen las células o se sometan a otros tratamientos. Las células sobre los cubreobjetos, se incubaron en presencia de la sonda, a una concentración 50 nM, durante 30 min a 37 °C. A continuación, se lavaron tres veces con PBS, se incubaron 24 h en presencia del FS (10 μ M), se lavaron tres veces más con PBS y se observaron directamente en el microscopio de fluorescencia con excitación azul.

8. Tinción de lisosomas in vivo con LysoTracker® Green

Para evaluar la posible colocalización del *m*-THPPo-lip con los lisosomas, las células crecidas en cubreobjetos se incubaron con el FS, a una concentración 5 μ M, durante 24 h. Después, se lavaron con PBS tres veces y se incubaron durante 30 min a 37 °C, con la sonda LysoTracker® Green (Invitrogen) diluida en DMEN sin suero a una concentración 50 nM. Finalmente, las células se lavaron tres veces más con PBS y se observaron directamente en el microscopio de fluorescencia con excitación azul. La sonda LysoTracker® Green consiste en un fluoróforo unido a una base débil, que a pH neutro solo

está parcialmente protonada. El mecanismo por el cual se acumula específicamente en los lisosomas no se conoce con precisión, aunque parece que durante el proceso la sonda sufre un proceso de protonación y queda retenida en la membrana de estos orgánulos. Al igual que en el caso anterior, esta sonda permanece en el interior de los lisosomas aunque se fijen las células o se sometan a tratamientos posteriores.

9. Tratamientos fotodinámicos

Para los tratamientos con ZnPc, las células se incubaron 1, 3 o 24 h con el FS incluido en liposomas (1 μ M), o bien durante 3 o 24 h con la ZnPc disuelta DMF (2 y 1 μ M respectivamente).

En los tratamientos con *m*-THPPo, las células se incubaron 24 h con el FS incorporado en liposomas (1, 2 o 5 μ M) o disuelto en DMSO (1 o 2 μ M).

Después de las distintas incubaciones, las células se lavaron tres veces con PBS, se les añadió DMEM con un 10% de SFB y se irradiaron con luz roja durante 10 min (tratamientos con ZnPc) o 15 min (tratamientos con *m*-THPPo). Los diferentes procesamiento experimentales se realizaron a distintos tiempos después de la irradiación.

10. Fuente de irradiación

La fuente de luz utilizada en nuestros experimentos fue un irradiador de LEDs (λ = 640 \pm 20 nm) con una intensidad de 4 mW/cm², medida con un M8 Spectrum Power Energymeter. La dosis de luz administrada en todos los experimentos fue de 3,5 J/cm². El dispositivo de irradiación estaba compuesto por 384 LEDs y poseía un área de irradiación de 11 cm x 15 cm.

11. Inhibidores de la endocitosis

Para estudiar los mecanismos de endocitosis implicados en la internalización del FS ZnPc, incluido en liposomas o disuelto en DMF, en células A-549 o HeLa, se utilizaron varios inhibidores de los procesos endocíticos, los cuales fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Estos compuestos fueron almacenados hasta el momento de su utilización siguiendo las siguientes indicaciones:

11.1. Dynasore (Dyn)

El Dyn es una pequeña molécula que interfiere con la actividad GTPasa de la dinamina, bloqueando las rutas endocíticas en las que esta proteína interviene: endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolinas y algunos tipos de endocitosis independientes de clatrina y caveolinas.

Para su almacenamiento y utilización, se siguieron las instrucciones indicadas por Kirchhausen y col (2008): el Dyn se diluyó en DMF a una concentración 200 mM, se realizaron alícuotas de 10 o 20 µl de esta solución madre y se almacenó en oscuridad a una temperatura de -20 °C hasta el momento de su utilización. Debido al pequeño volumen de las alícuotas, y para prevenir que durante la descongelación de éstas, se condensase humedad que diluyera la solución madre, antes de los experimentos el Dyn se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente antes de abrir las alícuotas.

11.2. Citocalasina D (CD)

La CD es un compuesto de origen fúngico, que altera los microfilamentos de actina provocando su desorganización, por lo que es un inhibidor eficaz de las rutas endocíticas dependientes de actina, tales como la macropinocitosis y la endocitosis mediada por caveolinas.

La CD se disolvió en agua destilada a una concentración de 100 µg/ml, se repartió en alícuotas de 1 ml y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

11.3. Genisteína (Gen)

La Gen es un compuesto de la familia de las isoflavonas, que actúa como inhibidor de las tirosina-kinasas de la familia Src, implicadas en la endocitosis mediada por caveolina, bloqueando de forma específica esta ruta endocítica.

La Gen se disolvió en DMF a una concentración 10 mM, se repartió en alícuotas de 30 µl y se almacenó a -20 °C. A igual que en el caso del Dyn, antes de los experimentos se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente para evitar la condensación de humedad.

11.4. Metil- β -ciclodextrina (M β CD)

Se trata de un oligosacárido cíclico capaz de extraer el colesterol de la membrana plasmática de las células en cultivo. Dado de que el colesterol es el elemento principal de las balsas lipídicas, la M β CD es un inhibidor de las rutas endocíticas que dependientes de estas estructuras.

La M β CD se almacenó en nevera a 4 °C, disuelta en agua destilada a una concentración 88,1 mM.

12. Tratamientos fotodinámicos en presencia de inhibidores de la endocitosis

Antes de comenzar los tratamientos, las células se lavaron 3 veces con PBS para eliminar los restos de suero. Después, se preincubaron 1 h con los distintos inhibidores diluidos en DMEM sin suero, a la concentración indicada para tipo celular (Tabla 1). De este modo, nos aseguramos que en el momento en que añadimos el FS, la ruta endocítica que deseamos inhibir, está ya bloqueada.

A continuación, las células se incubaron durante el tiempo correspondiente (1, 3 o 24 h) con el inhibidor, ya fuera en presencia o ausencia de ZnPc (incorporada en liposomas o disuelta en DMF). Después de la incubación, las células se lavaron con PBS (x3) y se procesaron inmediatamente, o se dejaron en DMEM con suero antes de procesarlas

Tabla 1. Concentración de los inhibidores utilizados en los estudios de endocitosis

Inhibidor	A-549	HeLa
Dynasore (Dyn)	80 μ M	40 μ M
Citocalasina D (CD)	5 μ g/ml	
Genisteina (Gen)	100 μ M	
Metil- β -ciclodextrina (M β CD)	1 mM	

13. Supervivencia celular

La supervivencia celular se midió 24 h después de los tratamientos por el método del bromuro del 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich). El MTT es un ensayo colorimétrico, basado en la capacidad del enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, de reducir el MTT a formazán, un compuesto de color azul insoluble en medios acuosos. Permite evaluar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, que es proporcional al número de células vivas. El MTT es uno de los métodos más utilizados para medir la supervivencia y proliferación celular.

Partiendo de una concentración stock de MTT disuelto en PBS (1 mg/ml), se diluyó en DMEM hasta una concentración final de 0,05 mg/ml, que se añadió a las células durante 3 h a 37 °C, para permitir que el formazán precipitara. Después se retiró el medio y se añadieron 0,5 ml de DMSO a cada pocillo (multiwell 24x24) para disolver el formazán precipitado. Se midió la absorbancia a 540 nm obteniéndose así el valor de la viabilidad celular, que viene expresada como el porcentaje de la absorción del formazán de las células tratadas respecto a la absorción de las células control.

Además, en cada experimento se realizó un blanco, para descartar la interferencia que el DMSO y el plástico de la placa de cultivo, tienen sobre los valores obtenidos en la absorbancia del formazán. Se incubó una placa multipocillo sin células con el MTT (0,05 mg/ml) durante 3 h, se retiró la solución, se añadieron 0,5 ml DMSO y se midió la absorbancia. La media de los valores obtenidos en estos pocillos, se restó a los datos obtenidos con las células, tanto control como tratadas.

14. Tinción con Hoechst 33258

La morfología nuclear de las células sometidas a los distintos tratamientos se valoró mediante tinciones con Hoechst 33258 (H-33258), un fluorocromo que se une de forma específica al ADN. Las células sembradas en cubreobjetos se fijaron con metanol frío 5 min, se dejaron secar al aire, se tiñeron con H-33258 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 µg/ml durante 2 min, se lavaron con agua destilada, se dejaron secar al aire, se montaron con DePeX y se observaron en microscopia de fluorescencia bajo excitación con luz UV.

15. Tinción con azul de toluidina

Para estudiar la morfología celular después de los tratamientos, las células crecidas en cubreobjetos se fijaron con metanol frío durante 5 min, se dejaron secar al aire, se tiñeron con azul de toluidina (AT; Merck, Alemania) al 0,05% m/v en agua destilada, durante 1 min, se lavaron con agua destilada, se dejaron secar, se montaron en DePex (Serva, Alemania) y se observaron en microscopía de campo claro.

16. Ensayo TUNEL

La fragmentación internucleosomal del ADN asociada a procesos apoptóticos, se evaluó mediante el ensayo TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling). Esta prueba se basa en la capacidad del enzima deoxinucleotidil tranferasa terminal (TdT), de catalizar la adición a los extremos 3'-OH libres del ADN, generados durante la apoptosis, de moléculas de dUTP marcadas con fluoresceína, tiñendo de este modo los núcleos que han sufrido un mecanismo de muerte de tipo apoptótico.

Tres horas después de los tratamientos, las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron 15 min con formaldehído diluido 1:10 en PBS, se lavaron con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,1% v/v) durante 2 min y se incubaron 1 h a 37 °C con la mezcla reactiva TUNEL (Roche, USA). Se lavaron con agua destilada, se montaron con ProLong y se observaron en el microscopio de fluorescencia con excitación azul.

17. Ensayo Annexina V/Ioduro de propidio

Durante las fases iniciales de algunos procesos apoptóticos y otros mecanismos de muerte, se produce la translocación de la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido presente en la cara interna de la membrana plasmática, que pasa a localizarse en la cara externa de la bicapa lipídica, lo que actúa como señal para atraer a los fagocitos, que endocitan los cuerpos apoptóticos resultantes del proceso de muerte celular.

Para evaluar la posible intervención de este evento en respuesta a los tratamientos fotodinámicos, se utilizó el kit para microscopía de fluorescencia Annexina V (ANV) conjugada con FITC (BD Biosciences, USA). La ANV es una

proteína capaz de unirse a la PS, por lo que es utilizada para discriminar *in vivo* aquellas células que presentan PS en la cara externa de la membrana plasmática. Para completar el ensayo, añadimos ioduro de propidio (IP), un agente intercalante del ADN, que tiñe de rojo el núcleo de las células que han perdido su integridad de membrana, pero que no es capaz de internalizarse en células con la membrana plasmática intacta. De este modo valoramos la translocación de PS (ANV) y la integridad de la membrana plasmática (IP).

A distintos tiempos después de irradiar, las células sembradas en cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS y una vez con el buffer de unión para Annexina-V. Las células se incubaron con ANV-FITC diluida 1:20 en el buffer de unión y con IP (1 µg/ml), durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se lavaron dos veces más con el buffer de unión y se observaron directamente en microscopia de fluorescencia bajo excitación azul.

18. Inmunofluorescencia indirecta para caspasa-2 activa

La caspasa-2 es una proteasa implicada en algunos procesos apoptóticos. Se encuentra en el núcleo, el citoplasma y en la cara citosólica del aparato de Golgi, actuando como iniciadora o efectora de la apoptosis en función de dicha localización. La activación de la caspasa-2 en respuesta a los distintos tratamientos fotodinámicos, se estudió utilizando un anticuerpo primario que únicamente reconoce la forma activa de esta proteína.

Después de los tratamientos fotodinámicos, las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron 15 min con formaldehído diluido 1:10 en PBS, se lavaron con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,1% v/v) 5 min, se incubaron 30 min con albumina sérica bovina (ASB, Sigma-Aldrich, USA) diluida al 3% (m/v) en PBS y se incubaron 1 h a 37 °C con 50 µl de anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de cabra anti-caspasa-2 activa, Santa Cruz Biotechnology, USA) diluido 1000 veces en ASB al 3%. Se lavaron con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón 5 min más y se incubaron 1 h a 37 °C con 50 µl del anticuerpo secundario (anticuerpo de burro anti-cabra marcado con Texas Red, Santa Cruz Biotechnology, USA) diluido 1:1500 en ASB 3%. Se volvieron a lavar con PBS (x3) y se contratiñeron los núcleos con H-33258 (5

µg/ml) durante 3 min. Se lavaron con agua destilada, se montaron con ProLong y se miraron en el microscopio de fluorescencia con excitación verde.

19. Inmunofluorescencia indirecta para golgina-130

Para evaluar la estabilidad del aparato de Golgi después de los tratamientos fotodinámicos, se utilizaron tinciones de inmunofluorescencia para golgina-130 (GM-130), una proteína de la matriz de dicho orgánulo, en el cumple funciones de tipo estructural.

Las células sembradas en cubreobjetos se fijaron 15 minutos con formaldehído diluido 1:10 en PBS, se lavaron con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,1% v/v) durante 5 min y se incubaron 1 h a 37 °C con 50 µl de anticuerpo primario monoclonal anti-GM130 (BD Transduction Lab, USA) a una concentración 1:100 en PBS. Seguidamente se lavaron con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón 5 min más y se incubaron 1 hora con 50 µl del anticuerpo secundario anti ratón marcado con FITC (1:200 en PBS). Posteriormente se lavaron con PBS (x3) y se contratiñeron con Ho-33258. Se lavaron con agua destilada y se montaron con ProLong. Las observaciones de las células se realizaron en microscopía de fluorescencia (excitación azul y ultravioleta)

20. Inmunofluorescencia indirecta para citocromo C

El citocromo C es una proteína localizada en la membrana mitocondrial interna y que interviene en la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, en respuesta a determinados estímulos apoptóticos, algunas proteínas de la familia Bcl-2 inducen la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, que permiten la liberación de esta proteína al citoplasma, donde se une a otras proteínas formando un complejo llamado apoptosoma, que desencadena las fases finales de la apoptosis.

Se estudió la localización el citocromo C después de los tratamientos fotodinámicos, para lo que las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron 15 min con formaldehído diluido 1:10 en PBS a 4 °C, se lavaron con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,1% v/v) durante 5 min y se incubaron 30 min en una solución de bloqueo (5% ASB, 5% SFB y 0,02% Triton X-100 en PBS) a

temperatura ambiente, para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo. Después, las células se incubaron 1 h a 37 °C con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de ratón anti-citocromo C, Invitrogen) diluido a una concentración 1:100 en solución de bloqueo (la misma que el anticuerpo primario), se lavaron 3 veces con PBS, se permeabilizaron de nuevo con Tritón X-100 (0,1% v/v) durante 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con FITC, Sigma-Aldrich) a una concentración 1:200 en solución de bloqueo, durante 1 h a 37 °C. Las células se lavaron con PBS, se contratiñeron con H-33258, se lavaron con agua destilada, se montaron con ProLong y se miraron en el microscopio de fluorescencia con excitación azul.

21. Tratamientos fotodinámicos en presencia de Necrostatina-1 (Nec-1)

Para estudiar la posible implicación de la necroptosis en el mecanismo de inactivación celular inducido por los tratamientos fotodinámicos con ZnPc, se utilizó un inhibidor específico de esta ruta de muerte, la Nec-1. Se trata de una pequeña molécula capaz de inhibir alostéricamente la actividad kinasa de RIP-1, una proteína implicada en las fases iniciales de la necroptosis. Dado que Nec-1 no afecta a otras de las funciones de RIP-1, se considera un inhibidor bastante específico de este mecanismo de muerte celular.

Las células se incubaron 1 o 3 h con Nec-1 (Sigma-Aldrich), diluida en DMEN sin suero a distintas concentraciones (100, 150, 200, 300 y 400 μ M), en presencia o ausencia de ZnPc. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se irradiaron durante 10 min en presencia de Nec-1 diluida en DMEN, a la misma concentración que durante las incubaciones. Después de irradiar, se sustituyó el DMEN con Nec-1 por DMEN con suero, en el que se mantuvieron las células hasta el momento de procesarlas.

22. Tinción con faloidina conjugada con rodamina (TRITC- faloidina)

La organización de los microfilamentos de actina después de los tratamientos con CD, se evaluó mediante tinciones con faloidina conjugada con rodamina. La faloidina es un compuesto de origen fúngico que se une a los microfilamentos de actina y los estabiliza, lo que permite utilizar este

compuesto conjugado con un fluorocromo, rodamina en este caso, para estudiar la estructura de los microfilamentos en microscopía de fluorescencia.

Las células crecidas sobre los cubreobjetos se fijaron 15 min con formaldehído (Panreac) diluido 1:10 en PBS, se lavaron con PBS tres veces y se permeabilizaron 5 min con Tritón X-100 (0,5% v/v, Sigma-Aldrich). Se añadieron 50 µl de TRITC-faloidina (Sigma-Aldrich) a concentración 1:200 en PBS, durante 45 min a 37 °C. Se lavaron con PBS (x3), se contratiñeron los núcleos con H-33258 a una concentración de 5 µg/ml, durante 3 min, se lavaron con agua destilada, se montaron con Prolong (Molecular Probes, USA) y se observaron en microscopía de fluorescencia con excitación verde y UV .

22. Inmunofluorescencia indirecta para tubulina

El efecto de la CD sobre el citoesqueleto de microtúbulos se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta para tubulina. Las células sembradas en los cubreobjetos se fijaron 5 min con metanol frío, se lavaron con agua destilada (x3) y con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,5% v/v) 5 min y se incubaron 1 h a 37 °C con 50 µl de anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de ratón anti-tubulina, Sigma-Aldrich), diluido en PBS a una concentración 1:100. Se lavaron con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón 5 min más y se incubaron 1 h y 15 min a 37 °C con 50 µl del anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con FITC, Sigma-Aldrich) a una concentración 1:200 en PBS. Se volvieron a lavar con PBS tres veces y se contratiñeron los núcleos con H-33258 (5 µg/ml) durante 3 min. Se lavaron con agua destilada y se montaron con Prolong. Las observaciones se realizaron en microscopía de fluorescencia bajo luz de excitación azul y UV.

23. Espectroscopía

Los espectros de absorción y la evaluación de la concentración de los FSs incorporados en los distintos vehiculizantes estudiados, se determinó utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Japón).

En los ensayos de supervivencia, la medición de la absorbancia del formazán formado tras las incubaciones de los cultivos con MTT, se realizó a 540 nm en un lector de placas Spectra Fluor (Tecan, Suiza).

24. Microscopía

Para la observación rutinaria de los cultivos celulares durante su mantenimiento, así como a lo largo y después de los distintos tratamientos, se utilizó un microscopio invertido Olympus CKX31.

Las observaciones microscópicas de las células sometidas a los distintos tratamientos, se realizaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX61, equipado con una lámpara de mercurio HBO de 100 W y filtros de excitación ultravioleta (365 nm), azul (450-490 nm) y verde (546 nm). Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital Olympus DP50 y se procesaron con Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems, USA).

25. Bibliografía

- **García-Díaz M**, Sanchez-García D, Soriano J, Sagristà ML, Mora M, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M, Nonell S (2011) *Temocene: the porphycene analogue of temoporfin (Foscan®)*. Med Chem Commun 7:616-619.
- **Giard DJ**, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) *In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst 51:1417-23.
- **Ginevra F**, Biffanti S, Pagnan A, Biolo R, Reddi E, Jori G (1990) *Delivery of the tumour photosensitizer zinc(II)-phthalocyanine to serum proteins by different liposomes: studies in vitro and in vivo*. Cancer Lett 49:59-65
- **Kirchhausen T**, Macia E, Pelish HE (2008) *Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis*. Methods Enzymol 438:77-93
- **Scherer WF**, Syverton JT, Gey GO (1953) *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix*. J Exp Med 97:695-710.
- **Soriano J**, García-Díaz M, Mora M, Sagristà ML, Nonell S, Villanueva A, Stockert JC, Canete M (2013) *Liposomal temocene (m-THPPo) photodynamic treatment induces cell death by mitochondria-independent apoptosis*. Biochim Biophys Acta DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.05.021.

Conclusiones finales

De este trabajo de tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El mecanismo de muerte inducido por el fotosensibilizante ZnPc, en células HeLa, es dependiente del tiempo de incubación, el cual determina la localización subcelular del FS en el momento de la irradiación, y por tanto, la diana primaria del tratamiento fotodinámico.
- Las incubaciones de 1 h con ZnPc inducen la inactivación celular por un mecanismo de tipo necrótico clásico, mientras que los tratamientos de 3 h producen una muerte celular de tipo necroptótico. Este trabajo es uno de los primeros en describir este tipo de muerte celular en respuesta a tratamientos fotodinámicos.
- El nuevo fotosensibilizante, *m*-THPPo o temoceno, presenta una propiedades fotofísicas adecuadas, una toxicidad en ausencia de irradiación muy baja y una localización subcelular dependiente del sistema de vehiculización en que se administre a las células HeLa.
- Los tratamientos fotodinámicos en células HeLa, con *m*-THPPo vehiculizado en DMSO, inducen un mecanismo de tipo apoptótico mediado por las mitocondrias, mientras que el temoceno incluido en liposomas produce un mecanismo de apoptosis independiente de estos orgánulos.
- El fotosensibilizante ZnPc se incorpora a las células a través de distintos mecanismos endocíticos en función del mecanismo de vehiculización en el que se incluya y de la línea celular a la que se administre.
- La ZnPc, incluida en liposomas de DPPC, es internalizada por un mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina, tanto en células A-549 como en células HeLa. Por el contrario, este mismo FS vehiculizado en DMF, penetra en células A-549 por un mecanismo endocítico mediado por caveolinas, mientras que en células HeLa es internalizado por una ruta endocítica independiente de clatrina y caveolina. Este estudio es el primero de este tipo realizado en el campo de la terapia fotodinámica.

Publicaciones relacionadas con esta tesis

- **Cañete M**, Soriano J, Villanueva A, Roca AG, Veintemillas S, Serna CJ, Miranda R, Morales MP (2010) *The endocytic penetration mechanism of iron oxide magnetic nanoparticles with positively charged cover: A morphological approach*. Int J Mol Med 26:533-539
- **García-Díaz M**, Sanchez-García D, Soriano J, Sagristà ML, Mora M, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M, Nonell S (2011) *Temocene: the porphycene analogue of temoporphin (Foscan®)*. Med Chem Commun 7:616-619.
- **Soriano J**, García-Díaz M, Mora M, Sagristà ML, Nonell S, Villanueva A, Stockert JC, Canete M (2013) *Liposomal temocene (m-THPPo) photodynamic treatment induces cell death by mitochondria-independent apoptosis*. Biochim Biophys Acta DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.05.021.
- **Soriano J**, Stockert JC, Villanueva A, Cañete M (2010) *Cell uptake of Zn(II)-phtalocyanine-containing liposomes by clathrin-mediated endocytosis*. Histochem Cell Biol 133:449-454
- **Soriano J**, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M (2013) *Vehiculization determines the endocytotic internalization mechanism of Zn(II)-phtalocyanine*. Histochem Cell Biol 139:149-160.

Trabajos en fase de redacción:

- **Soriano J**, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M *Cell line determines the endocytic internalization mechanism of Zn(II)-phtalocyanine included in different vehicles*.
- **Soriano J**, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M *Zn(II)-phtalocyanine included in liposomes induces cell death by regulated necrosis in HeLa cells*.

Agradecimientos

Cuando tenía tres años le dije a mis padres que quería ser "escritor de animales". La palabra biólogo no entraba en el vocabulario de un niño tan pequeño y la posibilidad de que existiesen cosas menores que un mosquito era algo inimaginable para mí, así que inventé esa profesión para describir lo que quería "ser de mayor".

Siempre me interesó saber cómo y por qué funcionaban las cosas que estaban vivas. Uno de mis primeros recuerdos es pasar las mañanas de verano persiguiendo a mi abuelo Pepe, mientras él "cazaba gamusinos" en la playa de los Alisios de La Manga del Mar Menor. Los "gamusinos", era como mi abuelo llamaba a unos gusanos que vivían enterrados en la arena dentro del mar (siento no ser más específico con el género y especie, pero hace casi 20 años que no veo uno), y que él usaba como cebo para pescar. Mientras los buscábamos, veíamos caballitos de mar, peces, cangrejos y muchos más "bichos" (ahora es difícil encontrar allí algo que no sea una medusa), que me dejaron fascinado. En esas largas mañanas de verano creo que comenzó mi interés por la Biología, por lo que supongo que la vocación me viene de lejos, como creo que nos pasa a todos los que nos metimos en esta carrera.

El tiempo pasó y descubrí que, efectivamente, había cosas mucho más pequeñas que un mosquito, y que a lo que me quería dedicar es a intentar entender cómo funcionaban. Y así llegó el instituto (donde tuve alguna duda de si este era mi camino), la carrera y ahora llego al final de este tramo que es el doctorado, y tengo mucho que agradecer a mucha gente:

En primer lugar, a mi directora de tesis, la Dra. Magdalena Cañete, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis y por su ayuda, dedicación y paciencia para que todo esto fuera posible. También a sus compañeros en el grupo de investigación, los Dres. Ángeles Villanueva y Juan Carlos Stockert, por su ayuda y colaboración estos años.

A todas mis chicas de A-115, con quienes he compartido grandes momentos a lo largo de estos 7 años. Hay gente que me decía que si no me volvía loco trabajando rodeado solo de mujeres, yo les digo que no cambio por nada este A-115.

En especial quiero agradecer a Maca y a Ana, por compartir mi día a día, tanto dentro como fuera del laboratorio, por aguantarme (sobre todo Maca), por su apoyo en los días buenos y en malos (especialmente en estos últimos) y principalmente, y creo que es lo mejor que me llevo de todos estos años, por darme su amistad.

También quiero agradecer a todas "las proyectos" que he tenido este tiempo trabajando conmigo, cuya colaboración a la hora de realizar esta tesis ha sido inestimable, durante las largas siembras, sesiones infinitas de lavados con PBS, experimentos que no salen y muchos otros momentos, tanto de estrés como de risas. Especialmente quiero mencionar a Marta, Patri y, sobre todo, a Isa (mi esbirra original), cuya ayuda en los experimentos iniciales con los inhibidores de la endocitosis, fue fundamental y con quien compartí algunos de los momentos más divertidos durante estos años en el A-115.

Además, también agradezco a toda la gente de la unidad de Citología y el departamento de Biología, con quienes he tomado un café, compartido una comida o, simplemente, he tenido una charla amena.

Entrando en el plano familiar, los primeros a quien tengo que dar las gracias es a mis padres, Ángel y Marisa. Aunque esto sea una sección de agradecimientos, pero nunca podré expresar con palabras la gratitud que siento por todo lo que me habéis dado. Vuestro amor, apoyo y consejo me han traído hasta aquí y me han convertido en lo que soy ahora. Siempre habéis confiado en mí de forma incondicional y me habéis ayudado a superar los peores momentos. Solo espero haber estado a la altura. Os admiro y os quiero (aunque no os lo diga lo suficiente).

A mis hermanos, Miguel y Dani. Sé que no somos muy dados a "pasteladas", pero con vosotros es con quienes he crecido, compartido juegos y ahora que no estoy en casa, es cuando más os valoro y más disfruto de vuestra compañía y de cualquiera de nuestras habituales conversaciones estúpidas.

A mi abuela Matilde, que aunque se le olvide lo que hago, ver su cara de orgullo cuando se lo recuerdo y su sonrisa sincera, siempre es una motivación para intentar ser mejor y llegar más lejos. Y a mis abuelos que no están:

Carmen, Pepe y Gil, ellos son parte fundamental de mí y me hubiera gustado que pudieran compartir conmigo este momento. Os echo de menos.

A mis tíos Nacho y Virginia, a mis primas Paloma y Almu y mi primo Iñaki, así como al resto de la familia, más o menos lejana, gracias por acompañarme siempre.

También quiero agradecer a todos los amigos y colegas que han estado a mi lado estos años. A muchos os he perdido con el tiempo, pero todos habéis compartido momentos de este viaje conmigo, y eso es lo que cuenta para mí. Especialmente quiero mencionar a los dos que más han estado a mi lado este último año: a Lauren, mi "compí" de piso, por sus post-it motivantes y porque durante la redacción de esta tesis, siempre tuve la posibilidad de encontrarte en el salón y desconectar un poco, tuvimos suerte cuando fuiste tú la que respondió al anuncio. Y a Rodri, por su amistad y su saber estar, siempre tienes una palabra sabia o de ánimo.

Tampoco me olvido de mi cuñada Paula y de toda la gente de Moratalaz (sois muchos para citaros uno a uno), que me acogieron como uno más desde el primer momento.

Y por último, quiero mencionar a mi profesora de Biología durante el Bachillerato, Julia Alonso, que me hizo retomar mi gusto por la Biología tras algunas experiencias "difíciles" con la asignatura de Ciencias Naturales durante la ESO. No sé si algún día leerá esta tesis, pero si no hubiera sido por ella, probablemente yo no estaría aquí.

En definitiva, a todos los que han compartido conmigo esta andadura, a los que aparecen aquí y a los que no... GRACIAS.